

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIRUGÍA Y SUS ESPECIALIDADES**



TESIS DOCTORAL

**COMPORTAMIENTO DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS
OXIDATIVO EN LA ORINA DE PACIENTES CON TUMOR
VESICAL NO MÚSCULO INVASIVO**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR JOSÉ ALBERTO HERNÁNDEZ MEDINA.

DIRIGIDA POR EL DR. D. JOSE MARÍA MARTÍNEZ JABALOYAS

VALENCIA OCTUBRE 2015

El Doctor:

D. José María Martínez Jabaloyas, Jefe de Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: “Comportamiento de los marcadores de estrés oxidativo en la orina de pacientes con tumor vesical no músculo invasivo”, presentada por Don José Alberto Hernández Medina para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa.

Y, para que así conste, firmo la presente en Valencia, a 29 de Octubre de dos mil quince

El Director::

Dr. D. José María Martínez Jabaloyas

“Eppur si muove”

- Galileo Galilei (1564-1642) -

Al **Profesor Dr. José María Martínez Jabaloyas**, maestro y amigo, quien no sólo aceptó la dirección de esta Tesis, sino que me ha animado y apoyado en cada uno de los trabajos de investigación más o menos ambiciosos que he desarrollado; por haberme guiado en el amplio mundo de la Urología y por estar siempre dispuesto a ayudar cuando he necesitado su apoyo o sus conocimientos de sabio.

Al **Profesor Dr. Francisco Dasí**, sin cuyo interés, esfuerzo y entusiasmo este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo.

Al **Dr. José María Limiñana Cañal**, quien ya me apoyaba para escribir esta tesis cuando aún estaba matriculándome en primero de medicina, y que estuvo ayudando y animando hasta el final con algo tan importante y delicado como el análisis estadístico.

A mi tío, **José María Hernández Otero**, quien, desde que era un niño, hizo que me enamorara de la ciencia, de la investigación, y que me ayudó a mantener siempre esa curiosidad infantil que nos mueve a seguir preguntando “¿y por qué?” y seguir asombrándonos con cada respuesta.

A mis **compañeros de residencia**: José Antonio, Raúl, Cristina, Nelson, Amparo, Ana y Andrés, por haberme ayudado en la ardua tarea de la recogida de datos, por haber echado tardes y tardes estudiando, investigando, haciendo ciencia... Por haber formado parte de mi crecimiento profesional y personal.

A **Mónica**, mi compañera en este camino que es la vida, por hacerme crecer cada día como persona, por estar a mi lado en los buenos y, sobre todo, en los malos momentos, sufriendo, junto a mi, el esfuerzo que conlleva sacar un trabajo como este adelante.

A **mi familia y amigos**, sin quienes yo no sería yo, sin cuyo apoyo, ánimo y cariño no hubiera podido completar ni ésta ni otras muchas de las metas que he alcanzado en mi vida.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Epidemiología del carcinoma urotelial vesical.....	21
1.1.1. Incidencia y distribución geográfica	21
1.1.2. Distribución por edad y sexo.....	21
1.2. Etiología y factores de riesgo de carcinoma urotelial vesical ...	22
1.2.1. Generalidades	22
1.2.2. Factores genéticos.....	23
1.2.3. Factores ocupacionales.....	23
1.2.3.1. Exposición a aminas aromática	24
1.2.3.2. Exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos	25
1.2.4. Tabaco... ..	25
1.2.5. Enfermedades Urológicas	27
1.2.6. Radiación Ionizante... ..	28
1.3. Clasificación histológica y clínica del carcinoma urotelial vesical.....	29
1.3.1. Clasificación histológica	29
1.3.2. Estadiaje y clasificación clínica.....	32
1.3.2.1. Estadio clínico	32
1.3.2.2. Grado de diferenciación histológica	34
1.4. Diagnóstico del tumor vesical	35
1.4.1. Pruebas de imagen	35
1.4.2. Citología urinaria.....	36
1.4.3. Cistoscopia	36
1.4.4. Marcadores moleculares en orina.....	37
1.4.4.1 NMP22.....	38
1.4.4.2. BTA	38
1.4.4.3. InmunoCYT.....	38
1.4.4.4. Análisis de microsatélites.....	39

1.4.4.5. Citoqueratinas	39
1.5. Concepto de estrés oxidativo	40
1.5.1 Concepto y génesis de radicales libres	41
1.6. Estrés oxidativo y su implicación en la oncogénesis.....	44
1.6.1 Estrés oxidativo: Implicación en el daño al material genético (ADN).....	44
1.6.2. Estrés oxidativo, señalización celular y cáncer	47
1.7. Cómo se mide el estrés oxidativo	49
1.7.1. Marcadores de estrés oxidativo	51
1.7.1.1. 15-F2t-Isoprostano	51
1.7.1.2. Malondialdehído.....	54
1.7.1.3. 8-hidroxi-d-guanina.....	57
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	61
III. MATERIAL Y MÉTODO	65
3.1. Diseño del estudio	67
3.2. Aspectos médico-legales	67
3.3. Sujetos del estudio	68
3.3.1. Población de referencia	68
3.3.2. Selección de casos	68
3.3.3. Selección de controles	69
3.4. Variables del estudio	69
3.4.1. Variables clínicas y epidemiológicas	69
3.4.1.1. Edad.....	69
3.4.1.2. Hábito tabáquico.....	69
3.4.1.3. Comorbilidad relacionada con estrés oxidativo	70
3.4.2. Anatomía patológica.....	71
3.5. Recogida de muestras	71

3.6. Determinación analítica de marcadores de estrés oxidativo.....	72
3.6.1. Determinación de los niveles urinarios de 8-OHdG.....	73
3.6.2. Determinación de los niveles urinarios de 15-F2t-Isoprostano.....	75
3.6.3. Determinación de los niveles urinarios de MDA.....	77
3.6.3. Normalización de los niveles urinarios de los marcadores según la creatinina.....	78
3.7. Citología urinaria.....	79
3.8. NMP22.....	79
3.9. Análisis estadístico.....	80
3.10. Referencias bibliográficas.....	82
IV. RESULTADOS.....	83
4.1. Descripción de la muestra.....	85
4.1.1. Características demográficas de población muestral.....	85
4.1.2. Características clínicas de la población muestral.....	88
4.1.3. Características patológicas del grupo de casos.....	91
4.2. Estudio de los marcadores de estrés oxidativo.....	93
4.2.1. Análisis de los posibles factores de confusión.....	96
4.2.1.1. Análisis intersujetos (Casos vs controles).....	96
4.2.1.2. Análisis intrasujetos (niveles pre y postoperatorios).....	103
4.2.2. Valoración de factores patológicos.....	105
4.3. Rentabilidad diagnóstica.....	108
V. DISCUSIÓN.....	111
5.1. Diseño y población del estudio.....	113
5.1.1. Diseño del estudio.....	113
5.1.2. Población del estudio.....	115
5.2. Metodología analítica.....	116

5.2.1. Medición de niveles de 8-OHdG	117
5.2.2. Medición de niveles de malondialdehído	118
5.2.3. Medición de niveles de 15-F2t-Isoprostano	119
5.3. Resultados.....	121
5.3.1. Variables clínicas	121
5.3.1.1. Edad.....	121
5.3.1.2. Distribución por sexos.....	123
5.3.1.2. Papel de la diabetes	124
5.3.1.3. Influencia del tabaquismo, dislipemia y cardiopatía isquémica.....	125
5.3.2. Marcadores de estrés oxidativo	126
VI. CONCLUSIONES.....	135
VII. BIBLIOGRAFÍA	139

Tabla 1.1: Clasificación TNM 2009	33
Tabla 1.2: Rendimiento diagnóstico de los test de diagnóstico molecular en orina para el cáncer vesical.....	40
Tabla 1.3: Criterios requeridos para los biomarcadores de estrés oxidativo	50
Tabla 4.1: Características de la muestra según grupo de estudio.....	89
Tabla 4.2: Distribución del hábito tabáquico según grupo de estudio.....	91
Tabla 4.3: Características patológicas de los casos	92
Tabla 4.4: Comparación de los niveles de los marcadores según grupo de estudio.....	95
Tabla 4.5: Comparación de los niveles de los biomarcadores antes y después de la cirugía.	95
Tabla 4.6: Comparación de los niveles de los marcadores entre los controles y los casos tras la cirugía.	96
Tabla 4.7: Precisión diagnóstica global de la citología y el NMP22.....	108

Figura 1.1: Imagen cistoscópica de metaplasia intestinal en paciente con enterocistoplastia de aumento.....	28
Figura 1.2: Imagen cistoscópica e histológica de tumor vesical	31
Figura 1.3: Representación esquemática de radical libre	41
Figura 1.4: Estructura molecular del 15-F2t-Isoprostano.....	52
Figura 1.5: Estructura molecular del Malondialdehído	55
Figura 1.6: Estructura molecular de la 8-OHdG.....	57
Figura 3.1: Curva de absorbancia estándar para la 8-OHdG.....	75
Figura 3.2: Curva de absorbancia estándar para el 15-F2t-Isoprostano	76
Figura 3.3: Curva de calibrado estándar para el malondialdehído	78
Figura 3.4: Imagen de Alere Bladder Check. Test positivo y negativo	80
Figura 4.1: Distribución de edad de la población muestral	85
Figura 4.2: Distribución de la edad en el momento de la recogida de la muestra, según grupo de estudio.....	86
Figura 4.3: Distribución de la población muestral según sexo.....	87
Figura 4.4: Diagrama de cajas para la variable edad por sexo, según grupo de estudio	88
Figura 4.5: Proporción de pacientes diabéticos según grupo de estudio	90
Figura 4.6: Histograma del tamaño tumoral en el grupo de casos	92
Figura 4.7: Niveles de 15-F2t-Isoprostano según grupo de estudio	93
Figura 4.8: Niveles de MDA según grupo de estudio	94
Figura 4.9: Niveles de 8-OHdG según grupo de estudio	94
Figura 4.10: Niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo según tabaquismo.....	97
Figura 4.11: Niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo según consumo de tabaco	97
Figura 4.12: Niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo según grupo de estudio y sexo	98

Figura 4.13: Niveles de 15-F2t-Isoprostano según grupo de estudio y sexo, homogeneizado por la edad	99
Figura 4.14: Niveles de 15-F2t-Isoprostano según grupo de estudio y presencia de diabetes, homogeneizado por la edad	99
Figura 4.15: Niveles de MDA según grupo de estudio y sexo, homogeneizado por la edad.....	100
Figura 4.16: Niveles de MDA según grupo de estudio y presencia de diabetes, homogeneizado por la edad.....	100
Figura 4.17: Niveles de 8-OHdG según grupo de estudio y sexo, homogeneizado por la edad	101
Figura 4.18: Niveles de 8-OHdG según grupo de estudio y presencia de diabetes, homogeneizado por la edad	101
Figura 4.19: Niveles pre y postoperatorios de 15-F2t-Isoprostano según presencia de diabetes, homogeneizado por la edad	103
Figura 4.20: Niveles pre y postoperatorios de MDA según presencia de diabetes, homogeneizado por la edad	104
Figura 4.21: Niveles pre y postoperatorios de 8-OHdG según presencia de diabetes, homogeneizado por la edad	104
Figura 4.22: Niveles de 15-F2t-Isoprostano según grado histológico.....	106
Figura 4.23: Niveles de MDA según grado histológico	106
Figura 4.24: Niveles de 8-OHdG según grado histológico	107
Figura 4.25: Niveles de los biomarcadores según estadio tumoral	107
Figura 4.26: Curva de rendimiento diagnóstico del 15-F2t-Isoprostano.....	109
Figura 4.27: Curva de rendimiento diagnóstico del MDA	109
Figura 4.28: Curva de rendimiento diagnóstico de la 8-OHdG.....	110

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA UROTELIAL VESICAL

1.1.1. Incidencia y distribución geográfica

El carcinoma urotelial de vejiga constituye el tumor más frecuente del tracto urinario, con una incidencia muy variable dependiendo de la región geográfica. Las tasas de incidencia se encuentran ligadas al nivel de desarrollo económico de los diferentes países y/o regiones, registrándose las tasas más altas en los países de Europa occidental y Estados Unidos y las más bajas en Asia y en los países del hemisferio sur (1). La tasa de incidencia ajustada por edad a nivel mundial es de 9 casos por cada 100.000 hombres y 2 cada 100.000 mujeres, sin embargo, estas cifras son más elevadas en la Unión Europea, donde constituye el séptimo cáncer más frecuente en varones, el decimoséptimo en mujeres y la octava causa de mortalidad cáncer específica. En este área presenta tasas de incidencia de 27:100.000 hombres y 6:100.000 mujeres y son aún más preocupantes en nuestro país, ya que España presenta las cifras de incidencia más elevadas de Europa (41.5:100.000 en hombres y 4.8:100.000 mujeres). (2)(3) Este tumor es responsable del 2,9% de todas las muertes por cáncer entre los hombres y del 1,5% entre las mujeres. A partir de la década de 1950, la incidencia en los países occidentales se ha incrementado un 50%, aumentando un 33% entre los años 1985 y 2000.

1.1.2. Distribución por edad y sexo

El cáncer vesical es típico de edades avanzadas, siendo la gran mayoría de casos diagnosticados en personas mayores de 65 años ($\approx 80\%$), raramente en menores de 50 años y de manera muy excepcional en menores de 10 años (sólo un caso documentado en menores de 10 años)(4). Esta característica subraya la resistencia biológica innata de las células uroteliales a los carcinógenos urinarios y plasmáticos.

En cuanto a la distribución por sexos, el carcinoma urotelial de vejiga es de 2,5 a 10 veces más frecuente en hombres que en mujeres. En los Estados Unidos el cáncer

vesical supone el 6% de todos los tumores en varones y sólo un 2% en las mujeres, con una tasa de mortalidad del 3% y 1% respectivamente. Sin embargo, se aprecia un incremento en la incidencia de esta enfermedad en mujeres y descenso en los hombres. Así, un estudio desarrollado por M. Bernal-Pérez y colaboradores (5), estima las proyecciones del carcinoma vesical en nuestro país hasta el año 2022 basadas en los datos de 1998 a 2007, previendo una disminución de la prevalencia de 156,93 a 132,99 casos por 100.000 habitantes/año en el año 2022 para los varones. Análogamente, la tasa de incidencia disminuiría desde 30,2 en 1998 a 24,87 y la mortalidad de 14,96 a 12,08 al comparar los años de 1998 y 2022. En las mujeres, los autores esperan un incremento de la prevalencia de 21,18 a 35,6 (TA = 21,46) casos por 100.000 habitantes/año. La incidencia de 4,8 en 1998 a 7,79 y respecto a la mortalidad, también estiman un aumento en las tasas de 2,25 a 3,37 entre los años 1998 y 2022

1.2. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

1.2.1. Generalidades

La exposición a carcinógenos ambientales constituye la principal causa de carcinoma urotelial. La superficie del urotelio se encuentra expuesta a la orina y, por consiguiente, a los posibles carcinógenos que se encuentren excretados en ella y a sus precursores, que pueden activarse por enzimas tisulares o disueltas a su vez en la misma orina. Este efecto, llamado “*field cancerization*” constituye una de las hipótesis que explica la multifocalidad del tumor vesical (una de sus principales características junto con la recurrencia)(6). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los tumores vesicales, pese a ser multifocales son de origen monoclonal, lo que sostiene la teoría de que se originan en una misma célula genéticamente alterada que se expande bien por vía endoluminal o a través del propio urotelio, implantándose en distintas localizaciones (esta teoría es conocida como hipótesis monoclonal).

El tumor vesical es el resultado final de una compleja combinación de factores endógenos o constitucionales y factores exógenos o ambientales. La carcinogénesis es un proceso o transformación mediante el cual, una célula urotelial normal experimenta cambios o mutaciones en genes específicos asociados con la oncogénesis, ya sea creando pro-oncogenes, anulando la acción de anti oncogenes o bien amplificando o sobre expresando genes normales que codifican factores de crecimiento a sus

receptores, debido a la exposición a agentes físicos, químicos y biológicos. Estas anomalías genéticas pueden inducir directamente la formación de un tumor vesical o alterar su historia natural y su respuesta a los tratamientos médicos, y pueden actuar de manera individual o en conjunto con factores externos.

1.2.2. Factores genéticos

Múltiples estudios epidemiológicos han estudiado el papel de los factores genéticos y la herencia como factores de riesgo en el desarrollo de tumor vesical. En la mayoría de estudios se ha evidenciado un pequeño aumento del riesgo en los familiares de afectos por tumor vesical, siendo este riesgo mayor cuando la enfermedad se diagnostica por debajo de los 60 años.

El riesgo relativo entre los familiares de primer grado de un paciente de tumor vesical es de 1.2 – 4 comparado con su población de referencia. Además, el riesgo relativo en gemelos monocigóticos es de 6.6 (IC 95% 2.6 – 16.9) y en gemelos dicigóticos de 1.7 (IC 95% 0.4 – 6.9)(7). Los síndromes familiares relacionados con elevada incidencia de tumor vesical son raros, y constituyen en torno al 1% de los tumores vesicales. En estos síndromes el tumor vesical toma un papel secundario, puesto que habitualmente se expresan otro tipo de neoplasias en otras localizaciones.

Existen alteraciones genéticas frecuentemente asociadas con el desarrollo de carcinoma urotelial de vejiga, siendo las más frecuentes las alteraciones del GSTM1 y del NAT2, ya que producen alteraciones de la acetilación (“acetiladores lentos”) incrementándose el efecto oncogénico de los factores ambientales (principalmente el tabaco). (8) Igualmente se aprecian alteraciones que afectan la escisión de nucleótidos y la reparación de la doble hélice de ADN, siendo la más frecuentemente asociada a cáncer vesical la alteración llamada ERCC2-XPD rs238406.

1.2.3. Factores ocupacionales

La exposición laboral fue la causa de aproximadamente un 20-25% del total de los tumores vesicales en los países industrializados al final del siglo XX. Gracias a los cambios de legislación y seguridad laboral, estas cifras se han reducido a un 5-10%. (9)

La identificación de carcinógenos ocupacionales potencialmente asociados con el cáncer vesical es complicada, ya que habitualmente existe exposición a complejas combinaciones de tóxicos, mutagénicos y carcinógenos; existe una latencia muy prolongada desde la exposición al desarrollo de la enfermedad y existen polimorfismos genéticos que influyen en la aparición del cáncer vesical. Existen diversos carcinógenos asociados con un incremento del riesgo de padecer cáncer vesical, así como se han identificado profesiones de riesgo en las que los agentes implicados aún no se han encontrado. Entre las profesiones de mayor riesgo se encuentran aquellas con exposición a aminas aromáticas y a hidrocarburos aromáticos policíclicos.

1.2.3.1 Exposición a aminas aromáticas

La relación entre la exposición a aminas aromáticas (AA) y el incremento del riesgo de cáncer vesical fue descrito por primera vez a finales del siglo XIX por el Doctor Ludwing Rehn, un médico alemán que reportó numerosos casos de cáncer vesical en trabajadores de la industria del tintado, relacionándolo con compuestos de anilina.(10) Posteriormente, en la década de 1950, Case et al documentaron que trabajadores de la industria del tinte de Inglaterra y Gales presentaban tasas de mortalidad entre 10 y 50 veces mayores de las esperadas, descartando la anilina e identificando como causa de esta elevada mortalidad la exposición a dos aminas aromáticas: 2-naftilamina y la bencidina. Posteriormente se identificaron otras aminas aromáticas: 4-aminobifenilo, 4-cloro-o-toluidina y 4,4'-metilenebis (2-cloroanilina)(11). La exposición a aminas aromáticas es ubicua en muchas actividades industriales y agrícolas, así como en el consumo de tabaco. Las AA se usan como antioxidantes en productos derivados de la goma, aceites industriales, pesticidas, tintes de azo (magenta o fucsina, auramina)... Las aminas aromáticas se pueden encontrar en muchos ambientes profesionales incluyendo industria química, metalúrgica, mecánica, textil y petroquímica. Numerosos estudios epidemiológicos demuestran sólidamente la relación entre la exposición laboral a estas sustancias y el incremento de riesgo de cáncer vesical

1.2.3.2 Exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos son un grupo de sustancias compuestas por dos o más anillos aromáticos unidos que se generan cuando materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno es expuesta a temperaturas superiores a 700° C, lo que ocurre en la pirólisis o combustión incompleta de biomasa o en la extracción, procesamiento y consumo de combustibles fósiles. Entre los 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos clasificados como posibles carcinógenos para el ser humano el benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno han sido relacionados con mayor riesgo de desarrollo de cáncer vesical (12). La exposición ocupacional a concentraciones tanto altas como medias y bajas se asocia con incrementos del riesgo de tumor vesical. En la manufacturación de aluminio, los trabajadores están expuestos tanto a hidrocarburos aromáticos como a aminas aromáticas (13). Además, los trabajadores de la industria metalúrgica están expuestos a un gran número de contaminantes químicos por inhalación y contacto mucocutáneo: aceites, lubricantes, refrigerantes, partículas de metales pesados, gases... los niveles de exposición dependen del tipo de industria, del tipo de trabajo, tiempo que se lleva desarrollando y las medidas tanto individuales como colectivas de prevención y seguridad laboral presentes en la legislación del país en donde se desarrolló la actividad industrial. En algunas industrias los niveles de benzo(a)pireno alcanzan concentraciones de hasta 100 g/m³ cuando en el aire ambiental están en el rango de nanogramos/m³

1.2.4. Tabaco

El consumo de tabaco en forma de cigarrillos es el factor epidemiológico más influyente en las tasa de incidencia de carcinoma urotelial en los países occidentales. Los carcinógenos presentes en el tabaco implicados en la génesis de estos tumores no han sido completamente identificados. Se conocen más de 60 carcinógenos y especies reactivas del oxígeno (ROS) presentes en el tabaco, incluyendo 4 amino-bifenilo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, aldehídos insaturados y especies reactivas del nitrógeno. Se ha demostrado que el hábito tabáquico produce daño sobre el material genético, apreciándose un incremento del 35-50% en la excreción urinaria de 8-OHdG (marcador de daño inducido por el estrés oxidativo sobre el ADN, como se explicará posteriormente) y aproximadamente del 20-50% en la 8-OHdG en leucocitos (14).

La relación entre fumar y el riesgo de cáncer vesical ha quedado patente en numerosos estudios de casos y controles, demostrándose de manera consistente un incremento de riesgo de desarrollar cáncer urotelial de vejiga en el brazo de fumadores.

Un trabajo prospectivo realizado en el *National Institute of Health-AARP Diet and Health Study Cohort*, Estados Unidos (15), incluía una base de datos con 465000 individuos que fueron seguidos desde el año 1995 hasta 2006. Se observó que en los fumadores existía un incremento del riesgo de presentar cáncer vesical, tanto en hombres como en mujeres (presentaban un riesgo relativo de 3.89 y 4.65 respectivamente). Así mismo se apreció un descenso del riesgo relativo en los ex-fumadores comparado con los que eran fumadores activos, presentando un riesgo relativo de 2.14 y 2.52 en hombres y mujeres respectivamente. Del mismo modo se apreciaba un riesgo relativo menor en las personas que fumaban pipa o cigarros puros pero no cigarrillos (RR 1.29)

En este estudio, la población en riesgo (expuestos a tabaco) era del 50% en hombres y del 52% en mujeres. Si se compraran estos resultados con estudios previos se puede apreciar que la proporción de casos atribuidos al consumo de tabaco permanece prácticamente constante en los hombres, pese a un descenso en el número de fumadores mientras que dicha proporción ha aumentado en mujeres, presumiblemente por un aumento del hábito tabáquico.

En cuanto a las consecuencias del abandono del hábito tabáquico, se ha comprobado que abandonar dicho hábito produce un descenso en el riesgo de desarrollar un carcinoma urotelial de vejiga, pero los estudios disponibles al respecto señalan que el riesgo relativo no muestra un descenso significativo hasta aproximadamente 20 años tras el abandono del tabaco. El descenso en el riesgo es de cerca de un 30% en los primeros 4 años tras dejar de fumar y de un 60% a los 25 años. (16) Incluso 25 años tras dejar de fumar el riesgo relativo no alcanza el de la población que nunca ha sido fumadora. Igualmente se ha comprobado que el abandono del tabaco produce un descenso del número de recurrencias de los tumores superficiales.

En cuanto a los fumadores pasivos, se ha podido objetivar que la exposición al tabaco de manera pasiva también incrementa el riesgo de desarrollar cáncer vesical. Un estudio llevado a cabo por Skipper y colaboradores (17) comprobó que las mujeres que convivían con 2 o más fumadores durante la infancia, tenían 3 veces más riesgo que aquellas que no habían estado expuestas, mientras que las mujeres que habían convivido

con una pareja fumadora durante al menos 10 años tenían el doble de riesgo que las que no. Estas asociaciones no se demostraron en hombres no fumadores.

1.2.5. Enfermedades Urológicas

Se ha encontrado asociación entre diferentes enfermedades de la esfera urológica y el ulterior desarrollo de carcinoma urotelial vesical.

El carcinoma urotelial de la vía urinaria superior (pelvis renal y uréter) presenta los mismo factores de riesgo para su desarrollo que el tumor vesical, por lo que no es sorprendente que pacientes que han padecido estas enfermedades presenten un mayor riesgo de desarrollo de tumor vesical, así como de tumores de vía superior contralaterales. En el momento del diagnóstico, hasta un 17% de los paciente presenta un carcinoma vesical concomitante, y la recurrencia de la enfermedad a nivel vesical ocurre en un 22-47% de los casos, apareciendo afectación ureteral contralateral en un 2-6% (18,19). Esta alta frecuencia de tumor vesical en pacientes con carcinoma urotelial de vía urinaria superior obliga al seguimiento mediante cistoscopias a los pacientes intervenidos por esta enfermedad.

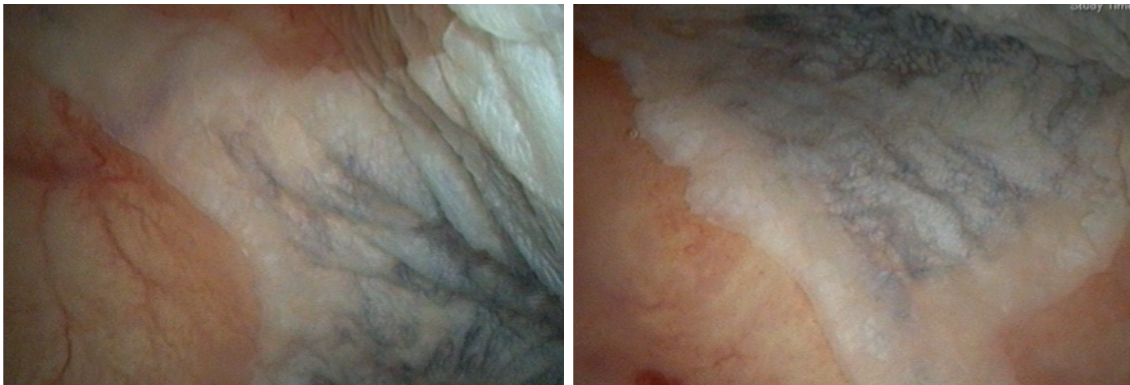
Padecer infecciones del tracto urinario inferior se ha relacionado con el desarrollo de carcinoma urotelial vesical en la mayoría de estudios de casos y controles. Se ha demostrado que, aquellos pacientes que presentan más de 3 episodios de ITU, presentan dos veces más riesgo de desarrollo de carcinoma urotelial de vejiga que aquellos que no han padecido infecciones (20) Además, el subtipo histológico de carcinoma de células escamosas es más frecuente en pacientes con infección crónica del tracto urinario inferior (pacientes con vejiga neurógena, portadores de sonda permanente...). El mecanismo que subyace en esta asociación es múltiple (21), destacando la irritación crónica debido a la infección. Este proceso irritativo crónico induce cambios metaplásicos que, posteriormente, pueden inducir displasia y finalmente carcinoma. La infección crónica predispone a uropatía obstructiva, sobreinfección bacteriana y la producción de nitrosaminas en el medio urinario ácido. Estas nitrosaminas son capaces de inducir carcinoma urotelial. Además, las bacterias son capaces de inducir la formación de radicales libres del nitrógeno y del oxígeno que conducen a situaciones de estrés oxidativo y daño tisular y genético.

La presencia de urolitiasis, independientemente de su asociación con las infecciones del tracto urinario, incrementa el riesgo de cáncer vesical (22). Además,

estudios recientes demuestran la existencia de situaciones de estrés oxidativo en relación con la presencia de urolitiasis. En este sentido, un trabajo de Carrasco y colaboradores (23) demuestra niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo derivados de la peroxidación lipídica (malondialdehído) en los pacientes de litiasis, así como un incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa para compensar esta situación de estrés oxidativo. Este comportamiento es más evidente en los pacientes que presentan litiasis coraliformes

La cistoplastia de aumento se emplea como tratamiento en casos de vejiga neurógena, microvejiga tuberculosa y en otras circunstancias donde la capacidad vesical está comprometida, afectando el normal funcionamiento y continencia. Estos procedimientos emplean segmentos del tracto intestinal (habitualmente íleo → íleocistoplastia) para incrementar el volumen y capacidad vesical, dejando mucosa intestinal expuesta a la orina y los carcinógenos que en ella se encuentran, produciendo metaplasia en dicha mucosa que posteriormente puede inducir displasia y formación de carcinoma. Se calcula que el riesgo acumulado es del 1% (24) con un periodo de latencia inferior a los 20 años.

Figura 1.1 Imagen cistoscópica de metaplasia intestinal en paciente con enterocistoplastia de aumento.



1.2.6. Radiación ionizante

Existe evidencia consistente que demuestra la asociación entre radiación ionizante y el desarrollo de tumores vesicales. Diversos estudios han documentado que pacientes expuestos a radiación con propósito médico, así como personas implicadas en accidentes nucleares, trabajadores de plantas nucleares o instalaciones radioactivas y

supervivientes de explosión nuclear, presentan una tasa de riesgo superior a la población no expuesta. Se ha comprobado que existe un incremento del riesgo relativo de 1.1 por cada Sievert de exposición en la población expuesta a las explosiones de Hiroshima y Nagasaki. Los mecanismos biológicos que explican esta asociación son: la acción directa sobre la doble hélice de ADN y la acción indirecta mediante la generación de radicales libres de oxígeno.(25)

1.3. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA Y CLÍNICA DEL CARCINOMA UROTELIAL VESICAL

1.3.1. Clasificación histológica

En su gran mayoría, aproximadamente un 90%, los tumores que afectan a la vejiga presentan diferenciación urotelial; es decir, en forma de epitelio poliestratificado o pseudoestratificado con un estrato superficial con abundantes placas y plegamientos de membrana, visibles mediante microscopio electrónico.(26) La capa más superficial, de células en sombrilla (*umbrella cells*), puede ser más o menos evidente. Existen dos grandes subtipos clínico-patológicos y moleculares de carcinoma urotelial no músculo-invasivos (27), el de *crecimiento plano* (carcinoma in situ) y el de *crecimiento papilar*, que probablemente se encuentran solapados o interrelacionados

- **Papilar:** este patrón de crecimiento aparece en aproximadamente el 75-80% de los carcinomas uroteliales. Los tumores papilares se caracterizan por presentar *papilas*, que son prolongaciones tapizadas por células uroteliales que contienen un estroma fibrovascular en su interior. El estroma puede presentar edema e incluso se pueden apreciar células cicatriciales descamativas, pero no hay atipia y las células superficiales (células en sombrilla) son, a menudo, prominentes. Las mitosis son muy raras y, de estar presentes, se encuentran en la membrana basal y no son anormales. Las lesiones papilares son frecuentemente diploides, de pequeño tamaño y con tasas de proliferación bajas. (28) Expresan citoqueratina 20, al igual que las células normales y, en estudios recientes, se ha demostrado la presencia de mutaciones en el gen FGFR3 hasta en el 75% de las lesiones, sin encontrarse alteraciones del gen p53. Estas lesiones tienden a ser *multifocales* y *recurrentes*. Existen tumores vesicales superficiales papilares para los

que no se emplea el término carcinoma, siendo los más frecuentes el papiloma, el papiloma invertido y la neoplasia papilar urotelial de bajo potencial de malignidad. El *papiloma* se define como una formación papilar (es decir, con un eje conectivo arborescente) revestido por urotelio de características normales. El papiloma invertido se caracteriza por la proliferación de yemas epiteliales análogas al revestimiento normal de la vejiga, pero con un crecimiento endofítico, es decir, en forma de invaginaciones hacia el interior de la lámina propia. Estas invaginaciones son distintas de las yemas infiltrantes del carcinoma (29). Por último, con término de *neoplasia urotelial de bajo potencial de malignidad* (NUPBPM)(30), se clasifican aquellos tumores papilares con un mayor número de capas que el epitelio vesical normal, sin atipia celular, desorden de la arquitectura ni actividad mitótica. Esta entidad ha sido propuesta por la OMS para evitar connotación de diagnóstico de malignidad en las lesiones más indolentes de este espectro de tumores, pero no existe acuerdo unánime sobre su existencia real ni consenso en su aplicación.

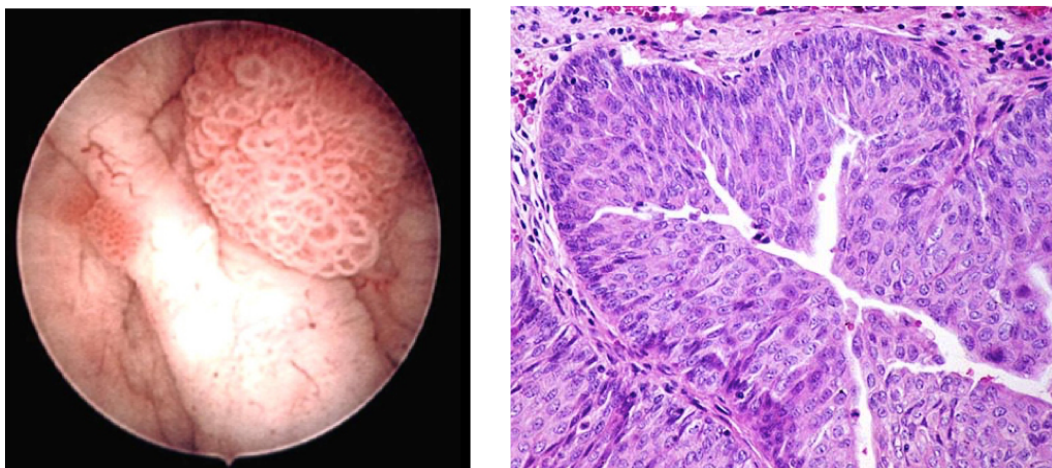
- **Plano:** los carcinomas uroteliales que presentan este patrón de crecimiento se denominan “**carcinoma *in situ*”** (Cis)(31), tratándose de lesiones que, pese a limitarse al urotelio, poseen una elevada capacidad invasiva y metastásica. Estos tumores presentan un elevado grado de anaplasia, con presencia de núcleos pleomórficos, agrandados, habitualmente con nucleolo también agrandado, hipercromáticos, con citoplasma eosinófilo, pérdida de la polaridad celular y con un espesor que puede afectar a todas las capas del urotelio. Macroscópicamente son difíciles de diferenciar, apareciendo con aspecto de mucosa sana o bien manifestándose como áreas eritematosas y/o edematosas, pudiendo haber cierto grado de erosión mucosa. Clínicamente, el CIS se manifiesta con más frecuencia entre la 5ª y 6ª década de la vida, pudiendo ser asintomático o relacionarse con síntomas del tracto urinario inferior de llenado (urgencia, incremento de frecuencia miccional, polaquiuria) así como de vaciado (disuria, hematuria). Se trata de lesiones de alto riesgo, con tasas elevadas de recurrencia, progresión (hasta el 55%) y mortalidad. (32) El carcinoma *in situ* primario (1-3% del total de neoplasias uroteliales) es menos propenso a la invasión que los secundarios (aparece asociado con un 7-15% de las neoplasias papilares y en un 45-65% de los tumores invasivos). Los pacientes con CIS y tumor invasivo concomitante tienen una tasa de mortalidad cáncer específica del 45-65% comparado con los que tienen CIS junto con tumor urotelial no invasivo que presentan tasas de mortalidad cáncer

específica del 7-15%. Aquellas lesiones planas que presentan un grado de atipia insuficiente para llegar a la consideración de *carcinoma in situ* se clasifican bien como *hiperplasia epitelial* (aumento del número de células sin atipia celular) o como *displasia epitelial* (aumento del número de células coja tipia celular inferior al del carcinoma in situ).

Otro patrón de crecimiento asociado con el carcinoma vesical es el **patrón sólido**. Este patrón se da aproximadamente en el 10% de los carcinomas uroteliales, y se relaciona con los tumores músculo infiltrantes (estadio mayor o igual al T2, que no son el objeto de estudio de la presente Tesis y que presentan un comportamiento biológico y clínico diferente). Supone una lesión formada por islotes celulares que contienen núcleos hipercromáticos de gran tamaño. (33)

Es importante tener presente que el urotelio normal posee como característica la capacidad para combinar rasgos de diferenciación glandular (luces intracitoplasmáticas) y escamosa (mayor abundancia de monofilamentos) Estos rasgos pueden encontrarse, por tanto, en tumores uroteliales y no implican su clasificación como adenocarcinoma o carcinoma escamoso. No obstante, una pequeña proporción de carcinomas vesicales superficiales pueden presentar una clara y predominante diferenciación glandular (adenocarcinoma) o un aspecto marcadamente escamoso (carcinoma escamoso). Otras variedades histológicas importantes son el carcinoma de células pequeñas, el carcinoma de uraco y el carcinoma de células claras.

Figura 1.2 Imagen cistoscópica e histológica de tumor vesical. (Extraído de la Colección de Donald Lamm)



1.3.2. Estadíaaje y clasificación clínica

Los tumores vesicales se clasifican en función de su estadio clínico (grado de invasión) y su grado de diferenciación histopatológica.

1.3.2.1. Estadío Clínico

El estadio indica el nivel de extensión del tumor entre las distintas capas del tracto urinario y/o su extensión a otros órganos. El sistema para clasificarlo se denomina TNM (del inglés, *Tumor, Node, Metastasis*) y fue desarrollado por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC)(34). Dicha clasificación atiende a los siguientes parámetros:

- **T** (Tumor): la puntuación “T” indica el grado de infiltración del tumor en las capas del tracto urinario.
- **N** (Node): hace referencia a la afectación de los ganglios linfáticos regionales por la enfermedad
- **M** (Metástasis): indica la presencia o ausencia de metástasis a distancia

Estos parámetros pueden evaluarse a partir del tejido tumoral obtenido mediante la resección transuretral del tumor (estadíaaje clínico) o tras el estudio patológico de la pieza de cistoprostatectomía radical, considerándose entonces como estadio patológico (en este caso las categorías TNM pasan a ser pT, pN y pM)

Según esta clasificación, una lesión papilar que invade la mucosa, sin sobrepasarla se clasifica como Ta; si existe invasión de la lámina propia T1. Estas lesiones pueden ser extirpadas en su totalidad en una resección transuretral, y se suelen agrupar con la denominación de **tumor vesical no músculo invasivo** (NMIBC), con propósitos clínicos y terapéuticos. Estas lesiones son el *objetivo del presente estudio*.

Sin embargo en este categoría también se incluyen tumores de alto grado limitados a mucosa y carcinomas in situ. Distintas técnicas de biología molecular y la experiencia clínica han demostrado el alto potencial de malignidad de las lesiones de alto grado así como de los tumores T1.

En los casos en que la capa muscular propia está invadida el tumor pasa a clasificarse como T2 (o superior) y pasan a denominarse tumor músculo-infiltrante, lesiones con tasas de mortalidad muy superiores a los NMIBC, con tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años de en torno al 58% y de supervivencia cáncer específica en torno al 60% (35)

La clasificación actual del TNM empleada en cáncer vesical es la 7ª edición, publicada en 2009, que, sin embargo, no introduce cambios con respecto a la anterior edición (2002) (Tabla 1.1)

Tabla 1.1 Clasificación TNM 2009

T. Tumor Primario	
Tx	No se puede evaluar el tumor
T0	No hay evidencia de tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : "tumor plano"
Ta	Carcinoma papilar no infiltrante
T1: Tumor que invade el tejido conjuntivo subepitelial	
T2: Tumor que invade la capa muscular	
T2a	Tumor que invade la capa muscular superficial (mitad interna)
T2b	Tumor que invade la capa muscular profunda (mitad externa)
T3: Tumor que invade la grasa perivesical	
T3a	Tumor que invade microscópicamente la grasa perivesical
T3b	Tumor que invade macroscópicamente (masa extravesical)
T4: Tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras: próstata, útero, vagina, pared pélvica o abdominal	
T4a	Tumor que invade la próstata, el útero o la vagina
T4b	Tumor que invade las paredes pélvica o abdominal
N: Ganglios linfáticos regionales	
Nx	no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	no se demuestran metástasis ganglionares regionales
N1	metástasis en un único ganglio linfático, de diámetro máximo \leq a 2 cm
N2	metástasis en un único ganglio linfático, de diámetro máximo mayor de 5 cm, o en varios, ninguno de ellos mayor de 5 cm de diámetro máximo
N3	metástasis en un ganglio linfático de diámetro máximo mayor de 5 cm
M: Metástasis a distancia	
Mx	no se puede evaluar las metástasis a distancia
M0	no hay metástasis a distancia
M1	metástasis a distancia

En el momento del diagnóstico, aproximadamente el 75% de los pacientes presenta un tumor confinado a la mucosa (Ta, T1 o Cis) (36)

1.3.2.2. Grado de diferenciación histológica

Además de los diferentes patrones de crecimiento histológico es muy importante la diferenciación histológica, es decir, el grado de similitud entre la célula tumoral y la célula de la que se origina la neoplasia. Los sistemas de gradación de los tumores uroteliales más difundidos y ampliamente aceptados, han sido los propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Dicha organización propuso en el año 1973 un sistema de clasificación y gradación histológica que ha sido el de referencia durante décadas (37). Este sistema de gradación dividía a los tumores en 4 categorías: papiloma urotelial, grado 1 (representa el menor grado de anaplasia necesario para categorizarse como *maligno*), grado 2 (grado intermedio de anaplasia) y grado 3 (grado severo de anaplasia). La clasificación como papiloma se basa en los criterios histológicos descritos previamente en este texto. En cuanto a los Grados 1-3, dicha clasificación corresponde a los grados de anaplasia celular, que fue definida por la OMS por la presencia de celularidad incrementada, alteraciones de la polaridad celular, cambios en la forma y los patrones de la cromatina nuclear, figuras mitóticas anormales, polimorfismos y presencia de células gigantes, entre otras características.

La principal crítica a este sistema de clasificación es la falta de definición clara en los puntos de corte que separa las diferentes categorías, existiendo problemas para el patólogo para diferencias entre los tumores de grado 2 mejor diferenciados de los grado 1 e, igualmente, entre los grado 2 más indiferenciados y el grado 3, lo que conllevaba una gran variación en las tasas publicadas de tumores grado 2 (variando entre un 13% a un 69%).

Por este motivo, en el año 1998 (38) este sistema de clasificación fue modificado, considerándose tan sólo 3 grupos: papilomas, tumores de bajo grado y tumores de alto grado. Posteriormente, en el año 2004 (39), la OMS añadió una nueva categoría: neoplasia urotelial de bajo potencial de malignidad (PUNLPM, del inglés

papillary urothelial neoplasm of low malignancy potencial). Estas lesiones presentan papilas muy discretas, delgadas y no fusionadas, presentando mínima o ninguna atipia. Su núcleo está ligeramente agrandado con respecto a la célula normal y las mitosis son raras y ocurren en la membrana basal.

1.4. DIAGNÓSTICO DE TUMOR VESICAL

El diagnóstico del tumor vesical se basa en una combinación de datos clínicos de sospecha y pruebas complementarias para confirmar su presencia.

En cuanto a la historia clínica, se debe incluir toda la información posible asociada con tumor vesical, incluyendo la exposición a factores de riesgo y síntomas sospechosos de tumor vesical. El síntoma más común es la hematuria, presentándose habitualmente como hematuria macroscópica monosintomática. Otros síntomas incluyen poliuria, disuria, urgencia miccional, dolor (estos últimos se relacionan más frecuentemente con la presencia de carcinoma in situ). Normalmente la exploración física no aporta información relevante en el diagnóstico del tumor vesical.

1.4.1. Pruebas de imagen

La ecografía es, a menudo, la herramienta diagnóstica inicial ante pacientes con hematuria y sospecha de tumor vesical. Se trata de una prueba no invasiva y que no somete a radiación ionizante ni precisa del uso de contraste iodados. La ecografía trans abdominal permite la detección de masas renales, alteraciones de la vía urinaria (por ejemplo, ectasia de vía urinaria por obliteración tumoral del meato ureteral) así como visualización de masas de crecimiento endovesical. La sensibilidad global de la ecografía para el diagnóstico de tumor vesical se sitúa entre el 90-63%, con una especificidad del 90-99%(40). Sin embargo, la ecografía falla habitualmente en la detección de lesiones planas, de pequeño tamaño (<1 cm) o en pacientes con hipertrofia de detrusor (por ejemplo en situaciones de vejiga de lucha). Así, la proporción de verdaderos positivos en tumores de <5 mm se sitúa en torno al 38%. En cuanto a la recidiva, el uso conjunto de la ecografía y la citología urinaria tiene una sensibilidad de

en torno al 78% (41).

La tomografía axial computerizada (TAC) en modo urografía es la prueba de imagen que más información aporta sobre el estado de la vía urinaria (42), sin embargo somete al paciente a una gran dosis de radiación ionizante. Esta prueba confiere gran información sobre la vía urinaria superior, empleándose habitualmente en casos de tumor de vía urinaria superior o para el estadiaje de tumor vesical infiltrante.

1.4.2. Citología Urinaria

El examen patológico de la orina o de muestras de lavado vesical, en búsqueda de células exfoliadas de origen tumoral, posee una alta sensibilidad para el diagnóstico de tumores de alto grado y baja en los tumores de bajo grado. Esto hace que la sensibilidad global de la prueba fluctúe entre un 28-100% (43). La citología urinaria es útil, principalmente, en combinación con la realización de cistoscopias, cuando estamos ante un carcinoma in situ o un tumor de alto grado. Una citología positiva puede ser indicativo de la presencia de tumor urotelial en cualquier punto de la vía urinaria, desde los cálices a la vejiga. La evaluación citológica es patólogo-dependiente (44), y puede ser artefactada por baja celularidad, lisis celular importante (por ejemplo en los estudios de la primera micción de la mañana), infección del tracto urinario, presencia de litiasis, tras instilación de medicación intravesical. En manos expertas, su especificidad puede superar el 90% (45).

1.4.3. Cistoscopia

El diagnóstico de tumor vesical depende del hallazgo cistoscópico y análisis patológico del material obtenido mediante resección transuretral. La cistoscopia inicial y de seguimiento (sin considerar la que se realiza como parte del propio procedimiento de resección transuretral) se realiza habitualmente de manera ambulatoria. Habitualmente se precisa del uso de anestesia tópica y de cistoscopios flexibles, siendo más tolerable que con el uso de cistoscopios rígidos (en este caso se precisa, en muchas ocasiones, la realización de la cistoscopia en quirófano). La sensibilidad de la cistoscopia es muy elevada, estando entre un 92-96% (46) según las series, con una especificidad de en torno al 95%. Sin embargo, la cistoscopia incluso con material

flexible, es un procedimiento invasivo que presenta riesgo variable de infección urinaria, lesión uretral, hematuria...

1.4.4. Marcadores moleculares en orina

Debido a la baja sensibilidad de la citología urinaria se han realizado numerosos estudios en busca de nuevos marcadores urinarios para la detección del tumor vesical. En la actualidad ya se dispone de diversos marcadores urinarios aprobados por la FDA para el diagnóstico del tumor vesical, como son el NMP22 (*nuclear matrix protein 22*), BTA (*bladder tumor antigen*), ImmunoCyt, Uro Vysion... que presentan, en líneas generales, una mejor sensibilidad que la citología pero con una menor especificidad, lo que condiciona un mayor número de falsos positivos. Todos estos marcadores a pesar de estar comercializados y de existir diversas publicaciones sobre su utilidad clínica, no se están empleando de manera sistemática en la práctica habitual, representando todavía la cistoscopia y la citología el “gold estándar” para el diagnóstico del cáncer de vejiga. Conocemos que las alteraciones genéticas que encontramos en el cáncer vesical son elevadas y muy variadas (47). Por ello, la tendencia actual es la búsqueda de marcadores genéticos (ya sea a nivel de DNA, RNA o proteínas) y moleculares que nos puedan indicar la presencia de carcinomas en la muestra analizada. Al ser una neoplasia heterogénea el hecho de buscar un único marcador para su diagnóstico y seguimiento no parece el procedimiento adecuado. Por eso el desarrollo de un panel diagnóstico que combine diferentes marcadores para el diagnóstico de esta neoplasia, puede ser de gran utilidad en un futuro, ayudando a disminuir el número de pruebas invasivas que, en la actualidad, son necesarias para el correcto diagnóstico y seguimiento de esta patología.

Existen una serie de requerimientos generales para considerar que un marcador es adecuado:

- la prueba debe ser técnicamente lo más sencilla posible
- Bajo coste
- Fiable y reproducible
- Alta especificidad y sensibilidad
- Ser capaz de detectar tumores de alto riesgo

1.4.4.1. NMP22: (*Nuclear Matrix Protein 22*)

Este test detecta la NMP22, proteína descrita por primera vez en 1974 (48) y que forma parte estructural del núcleo celular, influyendo tanto en la replicación como en la transcripción del ADN, así como en la regulación de la expresión genética. La concentración de esta proteína en orina se halla más elevada (entre 20 y 80 veces)(49) en aquellos pacientes con tumor vesical en comparación con los pacientes sanos. En un estudio desarrollado por Kibar y colaboradores, en el que se comparó NMP22 con la citología, la sensibilidad fue mucho mayor para el NMP22 (52% frente a 14%)(50). Además, demostró una mejora en la detección de tumores de bajo riesgo. La desventaja es que esta proteína se expresa también en los leucocitos, así pues, se puede encontrar elevada en aquellos casos de hematuria, infección urinaria o piuria.

Actualmente el NMP22 está disponible comercialmente en dos test: el NMP22 Bladder Check (el que empleamos en el presente trabajo) y otro test NMP22 que realiza un ELISA usando una microplaca con dos anticuerpos monoclonales

1.4.4.2. BTA (*Bladder Tumor Antigen*)

Esta prueba diagnóstica detecta el factor del complemento humano H, producido por las células de carcinoma urotelial vesical, en orina. Existen en la actualidad dos test diseñados para ello: el BTA stat (test cualitativo) y el BTA-TRAK (test cuantitativo).

El BTA stat es un test de enzoinmunoensayo que utiliza dos anticuerpos monoclonales que reconocen dos epítomos del factor del complemento humano H (hCFHrp) presentes en la orina. Con una sensibilidad del 29-83% y una especificidad del 56-86%. En el caso del BTA TRAK también se trata de un enzoinmunoensayo pero que se realiza en una placa. La sensibilidad y especificidad de este test es del 53-91% y 28-83% respectivamente. (51)

1.4.4.3. ImmunoCyt™

El Inmuno Cyt™ es un test de inmuno ensayo que combina la citología con la inmunocitofluorescencia. Emplea tres anticuerpos monoclonales para detectar la forma glicosilada del antígeno carcinoembriario y glicoproteínas mucínicas en células

exfoliadas, concretamente los antígenos M344, LDQ10 y 19A211, que son específicos para cáncer de vejiga y los detecta mediante microscopio de inmunofluorescencia. Este test ofrece una elevada sensibilidad y especificidad (84-75% respectivamente), que se incrementa aún más cuando se usa conjuntamente con la citología (52)

1.4.4.4. Análisis de Microsatélites

Los microsatélites son secuencias de ADN en las que un fragmento, cuyo tamaño puede variar desde dos hasta seis pares de bases, se repite de manera consecutiva. Estos fragmentos se localizan a lo largo de todo el genoma humano y son altamente polimórficos.

Mediante análisis de microsatélites se ha obtenido una buena sensibilidad (58-92%) para el diagnóstico del tumor vesical, así como una elevada especificidad (73-100%) (53). En un estudio prospectivo el análisis de LOH consiguió mejores resultados que la citología, especialmente para tumores de bajo grado. Para los tumores de grado 1 y 2 la sensibilidad fue del 60 y 51,8% comparado con el 10 y 18,5% obtenido mediante la citología. Al combinar las dos técnicas se mejoraba la sensibilidad de manera importante (54).

1.4.4.5. Citoqueratinas

Se han desarrollado diferentes test que permiten la detección de varias citoqueratinas relacionadas con el cáncer vesical. Uno de estos test es el CYFRA 21-1 que detecta el fragmento soluble de la citoqueratina 19 (55). Mediante inmunocitología o RT-PCR se puede detectar la citoqueratina 20 (CK 20) en pacientes con cáncer vesical con sensibilidad y especificidad variables (71-100% y 67-96,7% respectivamente) (56). Un estudio recientemente publicado ha observado que la determinación de interleukina -13 y la proteína de estrés HSP60 ofrecían un valor predictivo positivo y negativo prometedores (74%-76% respectivamente), en un pequeño número de pacientes (57)

Además de estos test, existen muchos otros en vías de desarrollo, como el estudio de la telomerasa, antígenos del grupo sanguíneo (Lewis), el Accu-Dx test, BLCA, estudio sobre el ácido hialurónico y la hialuronidasa, la survivina o la proteína

DEK. Si bien existe un creciente interés en el empleo de marcadores de estrés oxidativo para el diagnóstico y seguimiento del tumor vesical, no se han desarrollado aún kits diagnósticos basados en estos marcadores.

Tabla 1.2 Rendimiento diagnóstico de los test de diagnóstico molecular en orina para el cáncer vesical. (58)

MARCADOR	Sensibilidad (global) %	Especificidad (global) %	Sensibilidad (Alto grado) %	Nivel de evidencia
UroVysion	30-86	63-95	66-70	3
Análisis de microsatélites	58-92	73-100	90-92	1b
Inmunocyt	52-100	63-74	62-92	3
NMP22	47-100	55-98	75-83	3
BTA stat	29-83	56-86	62-75	3
BTA TRAK	53-91	28-83	74-77	3
Citoqueratinas	12-88	73-95	33-100	3

1.5. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha señalado en esta introducción, los principales factores de riesgo de tumor vesical producen situaciones de estrés oxidativo, generando una serie de cambios que inducen la oncogénesis.

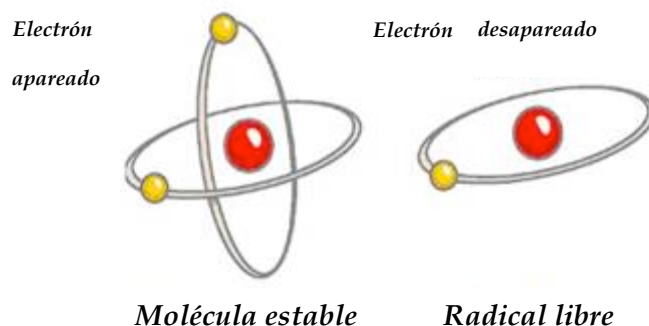
Se define el estrés oxidativo como una alteración del equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) y los mecanismos de defensa antioxidante (59). El término “estrés oxidativo” está ampliamente aceptado, sin embargo, conviene señalar que este término está vagamente definido, ya que no se señala cuán importante debe ser el desequilibrio antioxidantes – oxidantes para que se considere *estrés oxidativo*. Los radicales libres se forman en grandes cantidades de manera irremediable, como producto de muchos de los procesos bioquímicos fisiológicos, y, además, estos radicales libres pueden ser generados como respuesta orgánica a la radiación electromagnética ambiental o consumidos directamente en forma

de contaminantes oxidativos, como el ozono y el dióxido de nitrógeno. Por estos motivos, existe un cierto grado de daño oxidativo presente en todos los individuos; la pregunta radica en qué niveles de daño oxidativo representan una situación no patológica y qué niveles representan estrés oxidativo. Debido a estas razones, algunos autores (60) defienden hablar del “status oxidativo” de cada sujeto, ya que este término nos permite referirnos tanto a situaciones fisiológicas como patológicas.

1.5.1. Concepto y génesis de radicales libres

Los radicales libres se definen como moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desaparejados en sus órbitas atómicas/moleculares. Estos electrones desaparejados normalmente generan un grado muy alto de reactividad al radical libre.

Figura 1.3 Representación esquemática de radical libre



Los radicales derivados del oxígeno (**ROS**, del inglés “*Radical Oxygen Species*”) representan el tipo más importante de los radicales libres generados en organismos vivos. El oxígeno molecular (O_2) tiene una configuración electrónica única, y es, en sí mismo, un radical. Si al dióxígeno se le adiciona un electrón, genera el anión superóxido (O_2^-). Este anión superóxido, proveniente tanto de procesos metabólicos como tras la activación del O_2 por irradiación física, está considerado como el ROS primario, y puede interactuar con otras moléculas para generar ROS secundarios, bien directamente o a través de procesos catalizados por enzimas o metales. La producción de superóxido ocurre principalmente en la mitocondria.

La cadena de transporte de electrones es la principal fuente de ATP en las células de mamíferos siendo, por lo tanto, esencial para la vida. Durante la transducción energética, un pequeño número de electrones se “fugan” hacia el oxígeno, formando el ROS superóxido. Mediciones realizadas en partículas submitocondriales sugieren que entre el 1 y el 3% de los electrones de la cadena mitocondrial se escapan y generan anión superóxido en lugar de reducir el O₂ a H₂O (61). El superóxido se produce tanto en el complejo I como el III de la cadena de electrones, y una vez en su forma aniónica, tiene estabilidad suficiente para atravesar la membrana interna mitocondrial. Recientemente se ha demostrado que el superóxido producido en el complejo I se libera exclusivamente en la matriz mitocondrial, no produciéndose escape de la misma en niveles detectables si la mitocondria está intacta (62).

Estos hallazgos señalan el punto de fuga de los electrones a nivel del Complejo I, llamado clúster hierro-sulfuro del brazo hidrófilo. Además, estudios llevados a cabo en el Complejo III, muestran liberación extramitocondrial de superóxido, pero las mediciones de peróxido de hidrógeno producido muestran que este superóxido representa menos del 50% de la fuga de electrones de la mitocondria. Se ha propuesto que el 50% restante de la fuga de electrones se produce por el superóxido que se libera a la matriz

El estado Redox de la célula está íntimamente relacionado con el hierro y el cobre, que se mantienen en un estricto margen fisiológico. Se ha sugerido que la regulación de los niveles de hierro asegura que no quede hierro intracelular libre, sin embargo, en situaciones de estrés, un exceso de superóxido produce liberación de hierro desde moléculas que lo contienen. Esta liberación de hierro debido al superóxido se debe a la acción de enzimas de la familia deshidratasa-liasa (63). La liberación de hierro (Fe²⁺) puede conllevar la generación de radicales hidroxilo (reacción de Fenton: Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH⁻ + OH•) Bajo situaciones de estrés, O^{•-} actúa como oxidante y facilita la producción de OH• a partir de OH haciendo al Fe²⁺ susceptible de incorporarse a la reacción de Fenton. El radical Superóxido participa en la reacción de Haber-Weiss (O^{•-} → O + OH• + OH⁻) que combina una reacción de Fenton con una reducción del Fe³⁺ por el superóxido, liberando Fe²⁺ y oxígeno (Fe³⁺ + O^{•-} → Fe²⁺ + O) (64).

Otros radicales derivados del oxígeno que se originan en los organismos vivos son: el radical hidroxilo (OH•), que es la forma neutral del ión hidróxido y posee una

gran reactividad, haciéndolo muy agresivo, con una vida media *in vivo* de aproximadamente 10^{-9} segundos (65); y los del sistema peroxilo (ROO^\bullet). El radical peroxilo más simple es HOO^\bullet , que es la forma protónica del superóxido ($\text{O}^{\bullet-}$) y se conoce habitualmente como radical hidroperoxilo o perhidroxilo. Se ha demostrado que éste radical perhidroxilo inicia la peroxidación de ácidos grasos mediante dos vías paralelas: el hidropéroxido de ácidos grasos independiente (LOOH^\cdot) y el dependiente. Éste último presenta más relación con los mecanismos de peroxidación grasa que suceden *in vivo*, mientras que la generación de LOOH^\cdot independiente se asocia más con las mediciones *in vitro* (66).

Los peroxisomas producen HO^\cdot , pero no $\text{O}^{\bullet-}$ en circunstancias fisiológicas y constituyen el principal sitio de consumo de oxígeno en la célula. Además, participan en muchas de las funciones que requieren el uso de oxígeno (67). El consumo de oxígeno en los peroxisomas conlleva la producción de OH^\cdot que posteriormente se emplea para oxidar diversas moléculas. Esta organela contiene también catalasa, la cual descompone el peróxido de hidrógeno y presumiblemente impide la acumulación de este componente tóxico. Además, se encarga de mantener el delicado equilibrio entre la actividad enzimática y la liberación y almacenamiento de los diferentes radicales libres, manteniendo un balance neto próximo al 0 (68). La manera en que este equilibrio se mantiene no está aún aclarada. Cuando se produce un daño sobre los peroxisomas y disminuye la actividad de sus enzimas consumidoras de OH^\cdot , éste se libera al citosol y se generan situaciones de estrés oxidativo.

Si una célula fagocítica, como por ejemplo un neutrófilo, es expuesto a una célula extraña, lleva a cabo una serie de reacciones conocidas como quemadura respiratoria. La nicotina-adenina dinucleótido fosfatasa (NADPH) oxidasa se encuentra principalmente en los neutrófilos en los que la producción de $\text{O}^{\bullet-}$ es suficiente como para producir una quemadura respiratoria suficiente para ocasionar lisis bacteriana. Este complejo enzimático consiste en dos componentes ligados a membrana, $\text{gp91}^{\text{phox}}$ y p22^{phox} , que incluyen al citocromo b558 (centro enzimático de este complejo). Tras su activación componentes citosólicos como p47^{phox} , p67^{phox} se translocan a la membrana creando la forma activa de la enzima. La NADPH oxidasa no fagocítica produce superóxido en una proporción del 1-10% con respecto a la que producen las células fagocíticas (69)

1.6. ESTRÉS OXIDATIVO Y SU IMPLICACIÓN EN LA ONCOGÉNESIS

Como se ha señalado previamente, los radicales libres interaccionan con múltiples biomoléculas, produciendo diferentes efectos, estando implicado en diversas patologías, incluyendo enfermedad cardiovascular, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, isquemia, cáncer, envejecimiento...

Estas enfermedades se pueden agrupar en dos grupos. El primero incluye aquellas enfermedades caracterizadas por una *situación pro-oxidante*, afectándose el estado Redox de la reacción tiol-disulfuro y la tolerancia a la glucosa, situación que se conoce como ***estrés oxidativo mitocondrial*** (principalmente veremos estas condiciones en la diabetes y en el cáncer).

Un segundo grupo lo constituyen aquellas enfermedades en las que nos encontramos situaciones de ***estrés oxidativo de origen inflamatorio***, con una actividad incrementada de la NAD(P)H oxidasa (lo cual conlleva aterosclerosis e inflamación crónica) o bien de la formación de ROS por parte de la xantina oxidasa (implicado en las situaciones de isquemia y de reperfusión)

Esta asociación sólida existente entre diferentes enfermedades crónicas y las situaciones de estrés oxidativo han conducido a la búsqueda de biomarcadores de estrés oxidativo para su uso clínico.

1.6.1. Estrés oxidativo: Implicación en el daño al material genético (ADN)

El estrés oxidativo induce desbalance en los equilibrios reducción-oxidación celulares, situación que se ha encontrado con más frecuencia en las células tumorales que en las células normales. Este desbalance Redox se ha relacionado, pues, con un estímulo oncogénico. La modificación permanente del material genético resultante del

daño oxidativo representa el primer paso en la mutagénesis, carcinogénesis y en el envejecimiento.

La mutación del ADN representa un paso crítico en la oncogénesis, y se ha demostrado la presencia de grandes cantidades de lesiones oxidativas del ADN en las células tumorales, hallándose, por tanto, una fuerte relación de este proceso en la oncogénesis (se han identificado más de 100 productos del daño oxidativo del ADN)

El daño oxidativo al ADN incluye rupturas en una o ambas cadenas del ADN, alteración en purinas, pirimidinas, desoxirribosa y cambios estructurales como la generación de vínculos cruzados en el ADN (70). Estos cambios pueden conllevar tanto a la estimulación como a la inhibición de la transcripción genética, errores en la replicación, activar vías de señalización celular, inestabilidad genómica... todas ellas situaciones que favorecen la carcinogénesis, y la implicación de los oxidantes parece un denominador común a todos ellos.

La lesión sobre el ADN que más ha sido estudiada es la formación de *8-OH-desoxi-Guanosina* (71). Esta lesión tiene gran importancia, puesto que se produce muy fácilmente y tiene un considerable efecto mutagénico, ya que puede causar mutaciones por transversión (se denominan mutaciones por *transversión* a las sustituciones de una purina por una pirimidina o viceversa) como G→T o G→A, cuyo acúmulo puede dar lugar a situaciones catastróficas para la célula. En el caso de los mamíferos, existen mecanismos que permiten corregir esta situación, mediante enzimas que inducen excisión de bases y excisión de nucleótidos, lo que conlleva la eliminación de esta base hidroxilada, por lo que se considera un potencial biomarcador de carcinogénesis.

Además de las especies reactivas del oxígeno, varios metales se han implicado en el daño inducido por estrés oxidativo, tanto por su capacidad para generar radicales libres como por su habilidad para captar tiol (SH⁻)

El estrés oxidativo inducido por el hierro se considera el principal determinante del cáncer de colon en seres humanos. La exposición laboral a asbesto (que contienen aproximadamente un 30% de hierro) induce la formación de asbestosis, segunda causa de cáncer de pulmón (72). La exposición laboral a cadmio se ha asociado con un incremento en el estrés oxidativo y mayor riesgo de cáncer. El cadmio es incapaz de generar radicales libres de manera directa por sí mismo, sin embargo, por vía indirecta puede causar daño genético inducido por estrés oxidativo. Se ha demostrado que el

cadmio puede producir la activación de proteínas celulares del tipo quinasa (proteína-quinasa C), lo cual resulta en la fosforilación de factores de transcripción y, consecuentemente, conlleva la activación genética. Se ha implicado el cadmio en la génesis del cáncer de páncreas y del carcinoma renal.

Los compuestos derivados del arsénico, con efecto carcinógeno bien establecido (73), son capaces de fijarse a grupos SH⁻ y provocar la inhibición de varias enzimas, incluyendo la glutatión reductasa. Además, algunos estudios como el desarrollado por K. Jomova y colaboradores (74), sugieren que el arsénico actúa como co-carcinógeno, no causando cáncer directamente, sino favoreciendo la acción de otros factores como la radiación ultravioleta o la acción del tabaco sobre el ADN, aumentando la acción mutagénica de estos factores. El efecto del arsénico sobre el gen p53 no se comprende aún del todo, demostrándose en diferentes estudios un aumento en la apoptosis mediada por p53, así como de la apoptosis independiente del p53. También se ha medido la expresión de la proteína del p53 que aparece

La principal fuente endógena de ROS, el consumo de oxígeno, muestra una clara y cercana correlación con la tasa de excreción de **8-OH-dG**, si bien el ejercicio moderado parece no tener efecto sobre sus niveles. Estudios transversales y experimentales no han podido demostrar la influencia de los cambios de hábito dietético ni de los suplementos de anti-oxidantes en el daño inducido por estrés oxidativo sobre el ADN.

Además de las especies reactivas del oxígeno, las especies reactivas del nitrógeno (RNS), como los peroxinitritos y el óxido de nitrógeno han sido implicados en el daño al ADN (75). Debido a su reacción con la guanina, el peroxinitrato forma 8-nitroguanina que, debido a su estructura, tiene el potencial de inducir la transducción de G:C → T:A. Esta lesión es poco estable en el ADN, sin embargo en el ARN presenta buena estabilidad, aunque aún no se ha podido demostrar su efecto sobre la carcinogénesis

A este efecto producido sobre el ADN nuclear y sus consecuencias en la oncogénesis, debemos añadir la participación del estrés oxidativo en forma de daño a nivel del ADN mitocondrial. Las mutaciones y alteraciones en los genes que codifican los complejos mitocondriales I, III, IV y V y las regiones hipervariables del ADN mitocondrial se han implicado en la génesis de diversas neoplasias en humanos (76). Si

bien no se ha podido confirmar en qué medida estas mutaciones sobre el ADN mitocondrial se implican en la oncogénesis ni cuáles son las células tumorales que presentan mutaciones mitocondriales, existe cada vez más información que soporta esta teoría. Por ejemplo, se han detectado fragmentos de ADN mitocondrial insertados en el ADN nuclear, lo que sugiere un posible mecanismo de activación de oncogenes (77)

A parte del daño producido directamente sobre el ADN, los procesos de peroxidación lipídica se han relacionado también con la oncogénesis. Una vez formados, los radicales lipoperoxilo (ROO^\bullet) pueden cambiar por medio de reacciones de ciclación a endoperóxidos, siendo el producto último de estas reacciones el *malondialdehído (MDA)* (78). El MDA ha demostrado ser mutagénico en células procariotas así como en células de mamíferos, demostrándose su papel carcinogénico en ratas. El MDA puede interactuar con bases del ADN (adenosina, guanina y citosina) para formar los aductos M_1A , M_1G y M_1C . (se considera *aducto* a los complejos que se forman cuando un compuesto químico se une a una molécula biológica, como ADN o proteínas, considerándose productos reversibles y reparables) Estos aductos se han encontrado en tejidos a niveles de aproximadamente 1.2 aductos por cada millón de nucleótidos, lo que conlleva unos 6000 aductos por célula.

1.6.2. Estrés oxidativo, señalización celular y cáncer

La señalización celular comprende a aquellos procesos mediante los cuales sustancias extracelulares producen una respuesta intracelular. Mecanismos de señalización aberrante se relacionan con diversos estados patológicos (79). Debido a que uno de los procesos regulados por señalización celular más importante y fundamental es el mismo crecimiento celular, alteraciones en la normal regulación de estos procesos pueden conducir a la formación de tumores. Se ha demostrado que los ROS interfieren con la expresión génica y las vías de señalización celular, siendo claves en el proceso de carcinogénesis. El mecanismo de regulación del crecimiento celular es muy complejo y, por lo tanto, el rol que juegan los ROS en este proceso depende del tipo y concentración de cada uno de estos radicales. La activación de los factores de transcripción, incluyendo la MAP-quinasa/AP-1 y la vía del NF- κ B, tiene efecto directo sobre la proliferación celular y la apoptosis (80).

Anomalías en el funcionamiento de los receptores de los factores de crecimiento están relacionados íntimamente con el desarrollo de muchos tumores (81). La acción de los ROS afecta a muchos receptores, entre los que se incluyen el factor de crecimiento epitelial (EGF: *epithelial growth factor*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF: *platelets derived growth factor*), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF: *vascular endothelial growth factor*). La sobreexpresión del EGF se ha relacionado con la génesis del cáncer tanto de pulmón como de riñón y vejiga. El PDGF se encuentra en células endoteliales, fibroblastos y en células mesenquimatosas, relacionándose su sobreexpresión con el cáncer de pulmón y próstata

El papel de los oxidantes celulares y de la activación del AP-1 en el proceso de oncogénesis está bien documentado (82). Uno de los efectos de la activación de la AP-1 es el incremento de la proliferación celular. Se ha demostrado que, tanto el c-fos como el c-Jun son reguladores positivos de la proliferación celular y su expresión puede ser inducida por radicales libres así como por sustancias promotoras (diversos metales, fenobarbital, TPA, TCDD, alcohol, radiación ionizante...). Además de afectar a la proliferación celular, la activación de AP-1 también actúa promoviendo o inhibiendo la apoptosis. Que la regulación de la apoptosis se realice en un sentido u otro depende del balance entre los genes pro- y anti- apoptóticos, el estímulo que generó la activación del AP-1 y la duración del mismo.

Las proteínas Ap1 también se han visto implicadas en la oncogénesis interaccionando con oncogenes activados, como Ha-ras (83) o NF- κ B (84). Los ROS también han sido implicados como segundos mensajeros en la activación de NF- κ B, vía factor de necrosis tumoral (TNF) e interleukina 1.

El gen supresor p53 juega un papel clave en la protección celular en los procesos oncogénicos. Este gen actúa previniendo que el ADN dañado se replique hasta que el daño cromosómico sea reparado o la célula entre en apoptosis. Los genes promotores de la apoptosis mediados por el p53, realzan la acción de los radicales libres de oxígeno. Sin embargo, el gen p53 también puede promover la expresión de antioxidantes que previenen la apoptosis. La mutación de p53 conlleva su inactivación y genera una situación pro-oncogénica muy importante, estando relacionada con aproximadamente la mitad de las neoplasias en el ser humano (85). El gen p53 se activa por radiación ultravioleta, hipoxia, radiación gamma, privación de nucleótidos y otros. Diversos estudios han relacionado mutaciones del p53 con la actividad de los ROS (86).

Como se ha señalado previamente, el ciclo celular se caracteriza por fluctuaciones en el equilibrio redox, mediado fundamentalmente por cambios intracelulares en la concentración de glutatión (87). Generalmente, un ambiente más reducido estimula la proliferación celular y un leve cambio hacia ambientes levemente oxidantes inicia la diferenciación celular. Igualmente, el balance redox es un determinante crítico en la activación de la apoptosis, ligado íntimamente con el gen Bcl-2. La familia del Bcl-2 constituye un grupo de genes que poseen un efecto pro-apoptótico (por ejemplo el gen Bax) (88) o bien anti-apoptosis (Bcl-2). Se ha descubierto que la sobreexpresión de Bcl-2 actúa inhibiendo al citocromo C, bloqueando la activación de caspasas y el proceso de apoptosis. (89) Las células cancerosas presenta sobreexpresión de Bcl-2, lo cual conduce a resistencia a la acción apoptótica mediada por ROS.

1.7. CÓMO SE MIDE EL ESTRÉS OXIDATIVO

En la actualidad no disponemos de técnicas que nos permitan medir el estrés oxidativo determinando la cantidad y actividad de las ROS de manera directa, de tal manera que, para su uso clínico y experimental, se han buscado diferentes marcadores de estas reacciones oxidativas. En términos generales, el estrés oxidativo puede medirse basándonos en los niveles de los subproductos de estas reacciones, tanto a nivel de la peroxidación lipídica como de la oxidación de proteínas y del ADN. Otra forma de medir las situaciones de estrés oxidativo, de manera indirecta, se basa en calcular el descenso en los niveles de sustancias antioxidantes (tocoferol, vitamina C, grupos tiol...).

Debido, por tanto, a la vida media corta de las especies reactivas del oxígeno, y al hecho de que no se puedan medir estas ROS directamente *in vivo* parece razonable el empleo de biomarcadores, que son productos de las reacciones no enzimáticas entre moléculas biológicas y ROS. La participación de enzimas en la formación de biomarcadores podría introducir un nivel de variabilidad difícil de controlar, por lo que no suponen buenos marcadores para el uso clínico y experimental. La medición de productos generados directamente por la interacción ROS – biomoléculas elimina este problema, y provee un índice directo de la extensión de las modificaciones inducidas

por el estrés oxidativo. Aunque estos niveles no miden los ROS *per se*, se asume que sus niveles son proporcionales a los de los ROS. De este modo, el principal requisito para que una sustancia se considere biomarcador de estrés oxidativo es su validación y medición *in vivo* contrastándose con un oxidante conocido, por ejemplo midiendo compuestos que producen ROS mediante espectroscopia de resonancia magnética. Con este fin se ha desarrollado el estudio BOSS (*Biomarkers of Oxidative Stress Status*). Este proyecto, desarrollado por el Instituto Nacional de Ciencias de la Salud y el Medio Ambiente (NIEHS) de los Estados Unidos, ha iniciado un estudio comparativo de los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo, empleando ratones a los que se les ha inducido una situación de estrés oxidativo intoxicándolos con tetraclorato de carbono.

Tabla 1.3. Criterios requeridos para los biomarcadores de estrés oxidativo

Consideraciones importantes	Características requeridas
<i>Referente a la biología de los radicales libres</i>	El biomarcador debe ser un producto específico de oxidación inducida por ROS
	El biomarcador debe incrementarse como respuesta a un agente que induzca estrés oxidativo (criterio de validación)
<i>Referente a la medición analítica</i>	El método de medición debe ser específico y no verse interferido por otras sustancias
	Debe ser un compuesto químicamente estable
<i>Recolección de la muestra y almacenamiento</i>	El método de recogida de la muestra debe ser no invasivo
	El almacenamiento de la muestra no debe producir un incremento del biomarcador (artefacto)
<i>Aplicabilidad en estudios humanos</i>	El biomarcador debe ser detectable en fluidos biológicos de individuos sanos
	Los niveles del marcador no debe alterarse con la dieta
	Los niveles del marcador deben tener poca variabilidad intra-individuo

La orina como medio para la detección de biomarcadores de estrés oxidativo representa un método no invasivo de fácil acceso, ya que se emite periódicamente de manera fisiológica. Además, se ha validado el uso de la primera micción de la mañana como medio adecuado para el estudio del estrés oxidativo, siendo buen sustituto de la orina de 24 horas. La orina, así mismo, representa una adecuada matriz para medir las modificaciones inducidas por el estrés oxidativo en las distintas biomoléculas, ya que

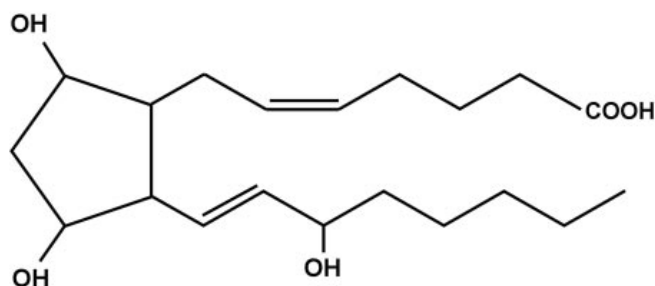
tiene una menor cantidad de metales, de promotores de especies reactivas de oxígeno y de material que pueda ser oxidado. Además se ha comprobado que es menos probable que se produzcan incrementos artefactuales de los marcadores de estrés oxidativo durante la recogida y almacenamiento de la muestra.

La peroxidación lipídica es la vía más estudiada, habiéndose empleado diferentes técnicas para la medida indirecta del estrés oxidativo, como la medición de reacciones del ácido tiobarbitúrico, dienos conjugados o la formación de *isoprostanos y de malondialdehído (MDA)*. Para la medición del grado de daño oxidativo sobre el ADN se emplea, de forma más extendida, la medición de *8-hidroxi-2'-desoxi-guanosina (8OHdG)*.

1.7.1. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

1.7.1.1.- 15-F2t-isoprostano (15-F2t-IsoP)

El 15-F2t Isoprostano es un isoprostano que se produce de manera endógena y abundante, que contiene un anillo prostano tipo F y pertenece a una familia con al menos 64 componentes “*prostaglandina F2 – like*”. Los F2 isoprostanos se forman durante la oxidación no enzimática del ácido araquidónico por diferentes tipos de radicales libres, incluyendo ROS (90). Dependiendo de la posición en que la molécula de oxígeno se añada al ácido araquidónico, nos encontramos con cuatro diferentes isómeros, que conforman las cuatro series de isoprostanos. Además, cada una de estas series comprende hasta 16 esteroisómeros, por lo que nos encontramos con hasta 64 diferentes tipos de IsoP. Debido a esta variedad amplia de isómeros, la nomenclatura de los isoprostanos es compleja y confusa, habiéndose propuesto distintos sistemas de nominación, usándose habitualmente los propuestos por Taber et al (91) y Rokach et al (92). Es por esto que el 15-F2t Isoprostano es también llamado 8-epi-prostaglandina F2 (8-epi-PGF2) o 8-iso-prostaglandina F2 (8-iso-PGF2), con la confusión que esto puede generar en tanto en la búsqueda de información científica como en la lectura de la misma.

Figura 1.4 Estructura molecular del 15-F2t-Isoprostano

Éstos isoprostanos son liberados a la circulación mediante la acción de fosfolipasas, y, posteriormente, son excretados a la orina como isoprostanos libres. Mediante este mecanismo también se generan isoprostanos con otros anillos, como E2/D2-Isoprostano, A2/J2-Isoprostanos así como compuestos *tromboxano-like* (isotromboxano), sin embargo, los F2-Isoprostanos han sido los más estudiados debido a su estabilidad, que les permite medir con precisión el estrés oxidativo (93)(94).

En la actualidad se han encontrado resultados contradictorios a la hora de explicar los mecanismos que conllevan a la formación de F2-IsoP, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha podido constatar la formación de isoprostanos debido a la acción enzimática de la ciclooxigenasa (COX) en el glomérulo renal de ratas. Además, se ha demostrado la inhibición en la formación de F2-IsoP por los inhibidores de la ciclooxigenasa, como el ácido acetilsalicílico, indometacina y el naproxeno. Pese a esto, con los estudios que se han realizado, debemos considerar que el 8-iso-PGF2 en humanos proviene de la peroxidación de ácido araquidónico mediado por radicales libres, y no por la vía de la peroxidación mediada por COX. (62)

Muchos de estos isoprostanos tienen una potente actividad biológica, actuando como vasoconstrictores a nivel pulmonar y renal, y modulando la activación plaquetaria. En general, poseen una vida media corta, si bien diversos estudios han probado que son marcadores fiables y consistentes de estrés oxidativo en diversas condiciones clínicas como en la diabetes, arterioesclerosis, inflamación crónica y aguda lesiones de isquemia-reperusión... Los isoprostanos también se han empleado para medir *in vivo* la respuesta oxidativa a diversos fármacos antioxidantes o intervenciones dietéticas.

Se han encontrado isoprostanos en todos los tejidos, en distintas concentraciones, así como en los distintos fluidos (plasma, orina, líquido sinovial, fluido bronquio alveolar, linfa, líquido pericárdico, fluido seminal...), si bien la orina y el plasma son los más frecuentemente empleados. Los isoprostanos se encuentran en el plasma en 2 isoformas: como ácidos libres o esterificados en lípidos, siendo la forma esterificada la más abundante, considerando que sólo los isoprostanos hidrolizados son excretados en orina.

Si bien la validez del F2-IsoP como biomarcador de estrés oxidativo parece clara, su medida y la de sus metabolitos es compleja. Como se señaló anteriormente, los isoprostanos son químicamente estables tanto *in vivo* como *in vitro*, pero, una vez son generados y liberados a la circulación, son metabolizados rápidamente y eliminados. Las técnicas actuales para su medición (enzima inmunoensayo – ELISA, cromatografía líquida, cromatografía en gas con espectrómetro de masas, radioinmuno análisis) son capaces de detectar isoprostanos en estado estacionario en muchos tejidos, lo cual ha permitido medir cualquier fluctuación en sus concentraciones después de cualquier grado de estrés oxidativo o peroxidación *in vivo*.

Aunque es cierto que los métodos basados en cromatografía se consideran el patrón oro (95), las técnicas de ELISA se están usando cada vez más en investigación debido a su menor coste y relativa sencillez. El problema que plantea es que aún no se dispone de suficiente evidencia sobre su precisión y sobre posibles variaciones en sensibilidad y especificidad entre los diferentes kits comerciales disponibles. Además, puede ser complejo diferenciar entre la amalgama de diferentes isómeros y metabolitos estructuralmente muy similares que esta familia presenta y que supone, en ocasiones, “reacciones cruzadas” entre las diferentes especies. Tal es así, que en algunos estudios se optaba por la medición de “F2-isoprostanos” urinarios, sin diferenciar entre isómeros específicos. Sin embargo, esta medición “de grupo” es muy inespecífica y se correlaciona mal con los cambios en los niveles de estrés oxidativo, por lo que se recomienda medir específicamente el isómero de interés (en el caso de este presente estudio, se midió específicamente el 15-F2t-Isoprostano). Los cuatro isoprostanos del tipo F2 han sido validados en modelos clínicos de estrés oxidativo (96), sin embargo sus asociaciones con distintas patologías puede ser diferente. Así, la asociación de los cuatro isómeros con la diabetes tipo II es muy similar (97) pero los niveles de estos isómeros en pacientes con sobrepeso varía sensiblemente (98). Además, la sensibilidad

de estos isómeros es también distinta siendo más o menos sensibles a diferentes situaciones. Este comportamiento puede ser explicado si aceptamos que diferentes metabolitos de estrés oxidativo generan diferentes isómeros de isoprostanos.

Pese a estas posibles limitaciones, se considera que para la cuantificación de la peroxidación lipídica, la medición de F2-IsoP es superior a otros métodos como la medición de TBARS, hidroxiperóxidos lipídicos o dienos conjugados, ya que estos métodos también presentan diferentes limitaciones metodológicas.

Por lo tanto, los isoprostanos poseen buenas cualidades como marcadores del estrés oxidativo: a) La formación de Isoprostano *in vivo* aumenta al aumentar el estrés oxidativo; b) pueden ser medidos de manera precisa a niveles picomolares con las técnicas antes mencionadas; c) se encuentran de manera consistente en los fluidos corporales, incluida la orina, lo que provee un medio de obtención fácil y no invasivo para su medición (se recomienda su medición en la primera orina de la mañana); d) sus valores no experimentan variaciones diurnas y no se afectan por el contenido en lípidos de la dieta (99); e) son productos específicos de la peroxidación; f) se encuentran en cantidades medibles en todos los tejidos y fluidos biológicos.

Se ha asociado la elevación de isoprostanos con diversas patologías: enfermedades pulmonares (asma, fibrosis quísticas, neumonitis intersticial, síndrome de distrés respiratorio agudo, fumadores crónicos...); enfermedades reumáticas: artritis reumatoide, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico artritis reactiva, osteoartritis; enfermedad cardiovascular: arterioesclerosis, angina, infarto de miocardio, enfermedad coronaria; enfermedades metabólicas como la hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión, obesidad; enfermedades neurológicas como el deterioro cognitivo y demencia, esclerosis múltiple; fallo hepático...

1.7.1.2. Malondialdehido (MDA)

El Malondialdehido (MDA) es un cetoaldehído producido de manera fisiológica por la descomposición mediante peroxidación de ácidos grasos insaturados y como subproducto del metabolismo del ácido araquidónico.

Figura 1.5 Estructura molecular del Malondialdehído

Existen tres hipótesis que describen la formación *in vivo* del malondialdehído. Pryor y Stanley (100), en el año 1975 publicaron un trabajo en el que, basando sus hipótesis en la naturaleza no volátil del precursor del MDA, describen el proceso mediante el cual, partiendo de un endoperóxido bicíclico y a través de numerosas reacciones similares a las que se dan en la formación de prostaglandinas, se genera el MDA. Postulan, además, que estas reacciones que desencadenan la formación del MDA se dan bajo circunstancias de estrés oxidativo. Este mecanismo de génesis del MDA fue confirmado posteriormente por Frankel y Neff (101), quienes observaron como lípidos oxidados eran capaces de generar MDA como subproductos de su degradación.

Las otras teorías están basadas en la formación sucesiva de hidroperóxidos y su reacción con cadenas de ácidos grasos para generar hidroxiperoxialdehídos. El MDA se formaría entonces por la β -escisión o por la reacción del radical acroleína con un radical hidroxilo.

Además, Hecker y Ullrich (102) describieron varios procesos enzimáticos que pueden dar lugar a la formación *in vivo* del MDA. Así, mostraron que la biosíntesis de tromboxano A_2 (TXA_2) lleva a la síntesis de MDA y de ácido 12(S)-hidroxi-8,10(E,E)-heptadecadiónico (HHT).

En su estado fisiológico y a pH neutro, el MDA está presente como anión enolato, y se comporta como una molécula de baja reactividad química. Sin embargo, esta molécula es capaz de interactuar con bases de ácido nucleicos para formar diferentes aductos. El principal producto de esta reacción se conoce como pirimido-(1,2-a)-purina-10(3H) desoxirribosa, que comúnmente adopta diversas abreviaturas en la bibliografía (M_1dG , M_1GdR o M_1G). Este M_1G se encuentra en equilibrio con la forma abierta de N_2 -oxopropenil-guanosina. El mecanismo de mutación propuesto más recientemente para este aducto ha sido el descrito por Vader Veen y colaboradores (103). Su estudio muestra claramente como el M_1G es capaz de inducir mutaciones

mediante sustituciones de pares de bases en el ADN bacteriano y de células de mamíferos. Por otra parte, se propone un mecanismo de genotoxicidad alternativo, basado en la habilidad del MDA para crear vínculos cruzados en el ADN con, potencialmente, múltiples efectos biológicos. Precisamente, Voitkun y colaboradores, demuestran en un estudio la habilidad del MDA para crear enlaces entre el ADN e histonas, incluso en situaciones con pH fisiológico. Todas estas actividades del MDA tienen un potencial efecto carcinogénico.

Varios trabajos han demostrado la presencia de niveles plasmáticos elevados de MDA en distintos tumores, como leucemias, cáncer de pulmón, de cérvix, de mama y de estómago (104).

Por otra parte, el exceso de MDA producido como resultado de lesiones tisulares puede reaccionar con grupos amino libres de diferentes proteínas (el MDA reacciona principalmente con residuos de lisina mediante adición de Michael), produciendo aductos proteicos modificados por el MDA. Estas alteraciones proteicas producidas por el MDA pueden conducir a alteraciones en sus propiedades y funciones biológicas. Además, estas proteínas alteradas tienen actividad inmunogénica, habiéndose detectado anticuerpos contra estos residuos de Lisina alterados por MDA. Algunos estudios han mostrado que el título de anticuerpos contra MDA-Lys se asocia con la carga aterosclerótica así como la progresión de dicha aterosclerosis y el desarrollo de coronariopatía e infarto de miocardio (105).

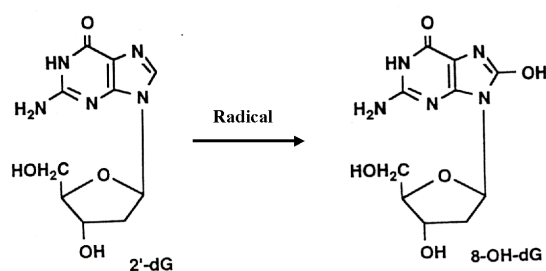
La importancia clínica de la reacción entre el MDA y las proteínas es destacada en la aterosclerosis. La formación de complejos MDA-LDL, además del LDL oxidado, tiene un comportamiento pro inflamatorio y pro-aterogénico que conduce a la formación de células espumosas. Además, los aductos de Apolipoproteína B-100 (Apo B-100) con residuos de MDA-Lys y con hidroxinonanal (HNE, un hidroxialqueno insaturado) han sido encontrados de manera consistente en las placas de ateroma.

También se ha encontrado que las concentraciones plasmáticas de MDA se ven incrementadas en la diabetes mellitus, así como en patologías de distinta naturaleza como la preeclampsia, la Enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Alzheimer.

1.7.1.3.- 8-hidroxi-d-guanosina

Como se ha señalado previamente, las especies reactivas de oxígeno pueden generar daño sobre el ADN celular bajo diversas condiciones, por lo que se han desarrollado diversas técnicas para medir las bases nucleolares oxidadas en este ADN, siendo la 8-OH-d-guanosina la alteración más estudiada (cómo se ha explicado en párrafos anteriores). Al igual que sucede con los isoprostanos, no existe estandarización para la nomenclatura de las lesiones por estrés oxidativo sobre el ADN. De este modo, la 8-OHdG responde a múltiples nombres: 8-hidroxi-2V-desoxiguanosina (8-OHdG), 8-oxo-2-desoxiguanosina (oxo8dG), 7,8-dihidro-8-oxo-2V desoxiguanosina (8-oxo-dG) y 8-oxo-7,8-dihidro-2V-desoxiguanosina (8-oxodG) (106). La presencia de este nucleótido oxidado, es la lesión producida por estrés oxidativo sobre el ADN más estudiada y detectada. Los niveles de 8-OHdG en orina se consideran tanto un indicador de la capacidad de reparación del ADN como un marcador del grado de estrés oxidativo celular (107). En el ADN, la hidroxilación de la guanosina por radicales libres de oxígeno en la posición 8 conlleva a la pérdida del adecuado emparejamiento de bases y, consecuentemente, a un error en la lectura de la información del ADN. Cuando esto sucede, se ponen en marcha diversos sistemas de reparación del material genético para intentar mantener la integridad genómica (108). Existe una evidencia creciente que muestra elevadas concentraciones de ADN con lesiones oxidativas en las células malignas (109,110).

Figura 1.6. Estructura molecular de la 8-OHdG



El daño oxidativo sobre el ADN está relacionado con un incremento del riesgo de desarrollo de neoplasias. El ataque de radicales hidroxilos sobre el ADN genera un

amplio rango de subproductos tanto en las bases como en diferentes glúcidos.

Estos subproductos de las reacciones entre radicales libres y el ADN pueden medirse tanto mediante técnicas de cromatografía: HLPC – “*High Performance Liquid Cromotography*”) o LC-MS (“*Liquid Cromotography with Mass Spectography*”) como mediante técnicas basadas en anticuerpos, principalmente técnicas de ELISA (“*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*”). Las ventajas y artefactos en la medición de 8OHdG han sido estudiados recientemente por Cooke y colaboradores (111). Los métodos basados en anticuerpos para la detección y medida de 8OHdG se han desarrollado recientemente, considerándose de buena utilidad, si bien pueden estar limitados al tratarse de métodos semi-cuantitativos. En cualquier caso, ni los métodos basados en cromatografía ni en uso de anticuerpos nos pueden indicar donde está localizado el daño genético. Además, existe la limitación de en qué material medir este daño tisular. La mayoría de estudios al respecto miden los niveles en ADN de linfocitos o leucocitos extraídos de muestras sanguíneas, asumiendo que el daño sobre el ADN medido es reflejo del daño tisular, sin disponer aún de la certeza de si estas medidas se correlacionan.

Las mediciones de 8OHdG en orina se han usado para determinar el nivel de daño oxidativo “total” del individuo, siendo muy complejo determinar el verdadero origen de este daño celular. Además, el 8OHdG puede aumentar por degradación de dGTP, no sólo por daño sobre el ADN. Tampoco se tiene conocimiento de las variaciones de las concentraciones del 8OHdG y su correlación con la intensidad de daño en el ADN.

En este sentido, Wu y colaboradores (106) realizaron un estudio empleando determinaciones mediante ELISA de los niveles urinarios de 8-OHdG con la finalidad de establecer el intervalo normal, encontrando que éste era de $43,9 \pm 42,1$ ng/mg de creatinina en mujeres y de $29,6 \pm 24,5$ ng/mg de creatinina en varones. El estudio incluía sujetos de 20 a 70 años. Empleando el percentil 95 como punto de corte superior, se seleccionó el nivel de 138.1 ng/ml de creatinina en mujeres y de 78.6 ng/ml de creatinina en varones. La diferencia entre las medias en hombres y mujeres era significativo ($p < 0,001$). En este trabajo estudiaron además el efecto del tabaquismo sobre los niveles de 8-OHdG, bajo la hipótesis de que los niveles deberían ser más altos en los paciente fumadores. Howard y colaboradores (112) encontraron que los niveles de 8-OHdG en sangre en trabajadores con exposición laboral al humo del tabaco eran un 63% superiores a los no expuestos. Además existen varios estudios que relacionan el

tabaco con el estrés oxidativo, como se explicó en la introducción del presente estudio. La mayoría de los efectos del tabaco han sido medidos en sangre o en tejidos. Wu y colaboradores (113) realizaron otro trabajo en el que hicieron las determinaciones en orina, apreciando que el impacto del tabaquismo en los niveles de 8-OHdG era bajo, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre fumadores y no fumadores. Apuntan a la posibilidad de que la amplitud del intervalo normal que lograron definir sea demasiado extensa para detectar estas diferencias.

Pese a que las mediciones de 8-OHdG se relacionan con el “status oxidativo global” del sujeto, diversos estudios muestran la relación de niveles elevados de 8-OHdG con la presencia de distintos tumores, como miomas uterinos, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón. Así mismo, se han encontrado niveles urinarios elevados de 8-OHdG en paciente con cáncer microcítico de pulmón.

Por lo tanto, existe evidencia que señala el posible uso de los niveles urinarios de 8-OHdG tanto para detectar el riesgo de padecer determinados tumores así como medir la actividad de los mismos.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los niveles urinarios de malondialdehído, 8-OH-desoxiguanosina y 15-F2t-isoprostano, biomarcadores de estrés oxidativo, son más elevados en pacientes que presentan tumor vesical que en pacientes sanos, siendo útiles para determinar la presencia de tumor vesical primario o su recidiva.

OBJETIVOS

Primario:

- Determinar los niveles de marcadores de estrés oxidativo en pacientes afectados de tumor vesical, antes y después de la cirugía, y en pacientes sanos

Secundarios:

- Analizar los diferentes factores pronósticos de tumor vesical (estadio patológico, grado histológico, número de tumores, volumen tumoral) y su relación con los niveles de estrés oxidativo

- Comprobar la evolución de los marcadores al tratarse quirúrgicamente el tumor y valorar su utilidad para el seguimiento del tumor vesical.

- Estudiar el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores de estrés oxidativo, determinando puntos de corte óptimo mediante curvas ROC y comparar su utilidad con la citología urinaria y el test NMP22

III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de casos y controles en el que se incluyeron pacientes diagnosticados de tumor vesical primario no músculo invasivo (categorías Ta y T1 de la clasificación TNM 2009) y pacientes control, sin antecedentes de patología tumoral. Se realizó determinación analítica de los niveles urinarios, medidos en la primera micción de la mañana, de 8-OH-desoxiguanosina (8-OHdG), 15-F2t-Isoprostano (IsoP) y malondialdehído (MDA) en ambos grupos. En el grupo de “casos” se realizó una segunda determinación urinaria de los marcadores, 1 mes después de haber sido intervenidos quirúrgicamente (resección transuretral de tumor vesical).

La recogida de datos clínicos se hizo de manera retrospectiva, extrayéndose de la historia clínica de los pacientes en el momento de la recogida de la muestra de orina. Para ello, se elaboró un formulario de recogida de datos (mismo formulario para los casos que para los controles), proceso durante el cual los pacientes fueron identificados empleando el número de historia clínica. Esta cifra de entre 3 y 6 dígitos es un código personal único, propio de cada hospital, y que permite la identificación indudable del sujeto en cuestión. De este modo, se registraron las variables clínicas que han sido relacionadas con situaciones de estrés oxidativo en estudios previos. Estos datos se recogieron inicialmente en una base de datos (Microsoft Access 2007) hasta su posterior análisis estadístico.

Para la realización de esta Tesis se contó con Financiación pública, proveniente de una Beca para Proyectos de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico para Grupos Emergentes, de la Consejería de Sanidad de la Comunidad Valenciana.

3.2. ASPECTOS MÉDICO-LEGALES

Este estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con los requerimientos expresados en la Declaración de Helsinki (revisión de Edimburgo, Octubre de 2000) y siguiendo las recomendaciones de la Buena Práctica Clínica de la CEE (documento 111/3976/88, Julio de 1990) y la normativa española vigente (Ley del Medicamento - 25/90, Real Decreto 711/2002, Circular 15/2001 de la AEM).

A todos los pacientes se les solicitó su consentimiento escrito para que sus datos fueran incluidos en este estudio. El presente proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los datos obtenidos se incorporaron a un fichero de datos de carácter personal y fueron tratados de forma confidencial conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos Personales 15/1999, teniendo acceso a ellos solo las personas autorizadas, pudiendo ser utilizados para posteriores investigaciones, siempre con la garantía del principio de confidencialidad y cumpliendo la legislación de nuestro país en materia de protección de datos.

Los investigadores implicados, personal médico y de enfermería, velaron por la seguridad del paciente durante el desarrollo del estudio.

3.3. SUJETOS DEL ESTUDIO

3.3.1. Población de referencia

La población de referencia, de la cual se han extraído los casos y controles que forman parte del presente trabajo, corresponde al Departamento de Salud N° 5 de la Consejería de Sanidad de la Comunidad Valenciana (Área 5. Valencia H. Clínic – Malvarrosa), con una población de, aproximadamente, 340.000 personas.

3.3.2. Selección de casos

Para el presente trabajo se incluyeron pacientes con diagnóstico de tumor vesical primario no músculo invasivo (categorías Ta y T1 de la clasificación TNM 2009), con confirmación histológica. La selección de los casos se hizo de manera no consecutiva, empleando la lista de programación quirúrgica del Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia para preavisar a los pacientes y poder disponer de la muestra de orina necesaria para el estudio (véase más adelante “*recogida de muestra*”). Se excluyeron aquellos pacientes con anatomía patológica de T0 (ausencia de tumor) o con estadiaje T2 o superiores (tumor vesical que infiltra músculo).

En los pacientes incluidos como “casos” la Resección Transuretral del tumor fue completa, no quedando tumor macroscópico ni afectación de los bordes o base tumoral (R0)

3.3.3. Selección de controles

Los controles fueron obtenidos de pacientes en seguimiento por patología no oncológicas, ni por procesos infecciosos o inflamatorios agudos o crónicos (es decir, en seguimiento por patologías sin relación etiopatológica con situaciones de estrés oxidativo), así como por familiares sanos de pacientes. No se realizó selección pareada de casos-controles, siendo la distribución de las variables clínicas (cardiopatía, diabetes, hábito tabáquico...) no controlada.

Se consideró criterio de exclusión, tanto para el grupo de casos como el de controles, presentar insuficiencia renal con filtrado glomerular inferior a 60 ml/min/1.73m² (correspondiente a estadio 3 de la clasificación de la *National Kidney Foundation* – Estados Unidos), puesto que un filtrado glomerular bajo puede alterar los niveles urinarios de los marcadores de estrés oxidativo, cuya determinación representa el objeto de esta Tesis.

3.4. VARIABLES DEL ESTUDIO

3.4.1. Variables clínicas y epidemiológicas

3.4.1.1. Edad

El tratamiento de la “Edad” como variable y el registro de la misma se hizo de dos maneras: diferencia de fechas (Fecha de recogida de la muestra – Fecha de Nacimiento) así como “edad en años cumplidos” en el momento de la recogida de la muestra de orina.

3.4.1.2. Hábito tabáquico

El hábito tabáquico se registró de manera categorizada. En los pacientes fumadores activos se registró el número de cigarrillos diarios (<10, de 10 a 20 o > 1 paquete al día).

3.4.1.3. Comorbilidad relacionada con estrés oxidativo

De cada paciente incluido en el estudio, bien en el grupo de casos, bien en el de controles, se recogieron de su historia clínica los siguientes antecedentes patológicos, que constituyen los factores patológicos relacionados con estrés oxidativo:

- Sexo (dicotómica)
- Diabetes mellitus (dicotómica)
- Hipercolesterolemia (dicotómica)
- Hipertrigliceridemia (dicotómica)
- Cardiopatía isquémica (dicotómica)
- Hipertensión arterial (dicotómica)
- Hepatopatía (dicotómica)
- Hipertiroidismo (dicotómica)
- Hipotiroidismo (dicotómica)
- Antecedentes de alcoholismo (dicotómica)
- Insuficiencia renal (dicotómica)

El sexo se recogió como variable dicotómica “Hombre/Mujer”, el resto de variables dicotómicas representan patologías cuya presencia se ha relacionado con situaciones de estrés oxidativo, y se registran como “Si/No”, dependiendo de si el paciente padece o no dicha patología.

La insuficiencia renal se recoge de manera categorizada, empleando la clasificación basada en el filtrado glomerular de la *National Kidney Foundation*, reconociéndose las categorías: 1 (normal), 2 (daño renal con filtrado glomerular ligeramente disminuido), 3 (filtrado glomerular moderadamente disminuido), 4 (filtrado glomerular gravemente disminuido), 5 (fallo renal), si bien no se incluyó ningún paciente con categoría 3 o superior (criterios de exclusión) por lo que la variable se trató como dicotómica (normal/insuficiencia renal leve).

3.4.2. Anatomía patológica

La confirmación diagnóstica de cáncer vesical se obtuvo con el estudio anatómo-patológico de los especímenes de resección transuretral de vejiga (sólo en los casos). Dicho estudio se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. El Estadiaje clínico se realizó según la clasificación TNM del año 2009 y la gradación histológica según la clasificación de la OMS de 1973. Así mismo se registró el número de tumores (recogido en el informe quirúrgico de cada paciente) y el tamaño tumoral, expresado en centímetros (recogido del informe patológico emitido por el Servicio de Anatomía Patológica).

3.5. RECOGIDA DE MUESTRAS

A todos los pacientes se les solicitó aportar una muestra de orina, emitida espontáneamente en la primera micción de la mañana. De esta muestra se separaron 30cc en tres tubos de ensayo separados (para las determinaciones de MDA, 15-F2t-Isoprostano y 8-OHdG), conservándose en congelador a temperatura de -80°C hasta el posterior procesado de la muestra. Se separaron, igualmente, 5 cc de la muestra de orina para la realización del test de diagnóstico NMP22 y el resto se remitió para estudio patológico (citología urinaria)

Al grupo de casos se les solicitó una segunda muestra de orina, para valorar el comportamiento de los marcadores después de la cirugía, recogándose dicha muestra un mes después de la cirugía, y antes de comenzar los tratamientos neoadyuvantes (instilación de mitomicina C o bacilo de Calmette-Guerin o bien reintervención quirúrgica) que por su estadiaje y gradación fuesen precisos. Esta muestra de orina procedía, igualmente, de orina emitida espontáneamente en la primera micción de la mañana.

Las muestras de orina se aconservaron a -80°C hasta su procesado.

3.6. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La determinación analítica de los niveles urinarios de 8-OH-desoxiguanosina y 15-F2t- Isoprostano, se realizó mediante test de ELISA, mientras que los niveles de Malondialdehído se determinaron mediante espectrofotometría (medición de aductos MDA-TBA₂).

La técnica ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) es un test de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo ligado a una enzima, que es capaz de generar un producto detectable (cambio de coloración, fluorescencia...) Las técnicas de ELISA son una evolución del enzima inmuno ensayo (EIA), en la que se emplea la unión de anticuerpos a los antígenos para identificar y medir sustancias por colorimetría. Las primeras publicaciones describiendo el uso de esta técnica datan de 1966, por los doctores Ancho y Porat. El nombre de ELISA fue acuñado por los investigadores suecos Eva Engall y Peter Perlman en 1971, cuando publicaron la descripción del proceso.

Existen distintos tipos de técnicas ELISA, siendo el ELISA competitivo la que se empleó para determinar los niveles de 15-F2t-Isoprostano y de 8-OHdG. El ELISA competitivo es la técnica más compleja de ELISA, y se usa para la medición de antígenos (o anticuerpos) en una muestra mediante la observación de interferencias en una señal esperada. Puede basarse en técnicas directas, indirectas o tipo sándwich. Se usa frecuentemente cuando solo existe un anticuerpo disponible contra el antígeno de interés o cuando la sustancia a analizar es muy pequeña. Si el antígeno en la muestra es idéntico al que está adsorbido en la placa, entonces existirá competencia por el anticuerpo entre el antígeno libre (muestra) y el unido a la placa. En ese caso, si la concentración del antígeno en la muestra es alta, la intensidad de la señal será menor y si la concentración del antígeno en la muestra es baja, entonces la señal será más intensa. Por lo tanto, con este tipo de ELISA, lo que estamos midiendo es la atenuación de la señal. Esta técnica es la que empleamos en el presente trabajo.

Para la medición de los niveles de MDA, nos basamos en la reacción del malondialdehído con el ácido-2-tiobarbitúrico (TBA), generando cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables, que pueden ser medidos por espectrofotometría de absorción visible. La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

En la espectrofotometría se aprovecha la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. La muestra absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante. En esta técnica se mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda utilizada. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química.

La espectrofotometría ultravioleta-visible utiliza haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 180 a 380 nm, y en el de la luz visible de 380 a 780 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro. Para la determinación de los niveles de MDA se empleó longitud de onda de 532 nm.

Los niveles de los marcadores se expresaron en ng/ml. Se expone, a continuación, la metodología empleada para la determinación analítica de cada uno de estos marcadores.

3.6.1. Determinación de los niveles urinarios de 8-OHdG

Para la determinación de los niveles urinarios de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, se empleó un kit comercial de ELISA, desarrollado por *Cell Biolabs*, con nombre “*OxiSelect™ Oxidative Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation)*”. Este marcador ha sido validado y empleado en diversos estudios clínicos (114)(115)(106).

El conjugado y la solución patrón de 8-OHdG se conservaron a -80°C y -20°C respectivamente; el resto del kit se conservó en nevera, a temperatura no superior a 4°C , siguiendo las instrucciones del fabricante.

Previo a la determinación analítica, las muestras de orina se descongelan durante 1 hora a 37°C . Posteriormente se centrifuga a 1500 G durante 5 minutos, empleando el sobrenadante para la determinación de 8-OHdG.

Se debe dibujar una curva estándar, para poder determinar los niveles de 8-OHdG. Para ello se preparan 10 disoluciones de la solución patrón de 8-OHdG proveída por el fabricante. Estas disoluciones varían en concentración desde los 0 ng/ml hasta 20 ng/ml de 8-OHdG. Una vez preparadas, se sigue el mismo procedimiento que con la muestra.

Se vierten 50 μL de la muestra y de solución patrón (proveída por el fabricante) en diferentes pocillos, impregnados del conjugado de 8-OHdG, dejándose incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. A estos pocillos, se les añaden 50 μL del anticuerpo primario dejando incubar en el agitador, a temperatura ambiente, durante 1 hora.

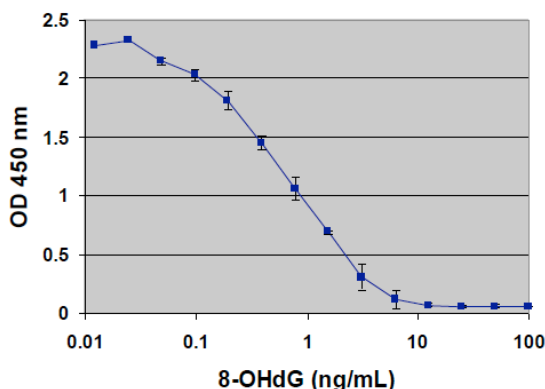
Tras la incubación, se procede al lavado y retirada del anticuerpo primario. Para ello se realizan tres ciclos de lavado con 250 μL de solución de lavado. Al completar los tres ciclos de lavado se deben vaciar los pocillos y voltear sobre papel secante, para facilitar el secado.

Añadimos 100 μL de anticuerpo secundario por pocillo, mezclamos y se vuelve a incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, nuevamente en un agitador orbital. Repetimos el proceso de lavado, tal como hicimos con el primer anticuerpo. Una vez terminado el segundo lavado, añadimos 100 μL de sustrato a cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente. El tiempo de incubación puede variar, entre 2 y 30 minutos, por lo que es necesario estar pendiente del viraje de color.

Al completar la incubación del sustrato, añadimos 100 μL de fijador a todos los pocillos y se procede a la medición de la absorbancia con espectrofotómetro a 450 nm. Se dibuja la curva estándar, con la que comparamos las muestras para obtener la concentración de 8-OHdG (ng/ml).

Figura 3.2. Curva de absorbancia estándar para la 8-OHdG

(Cell Biolabs, Inc)



3.6.2. Determinación de los niveles urinarios de 15-F2t-Isoprostano

Para la medir los niveles urinarios de 15-F2t-Isoprostano, se empleó también un kit comercial de ELISA de la casa *Cell Biolabs*, “*OxiSelect™ 8-iso-Prostaglandin F2α ELISA Kit*”. Al igual que sucedía con el kit empleado para la 8-OHdG, este test ha sido validado y empleado en diversos estudios. (95)(116)(117)

Los componentes del kit se conservaron a diferentes temperaturas, siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución patrón de 8-iso-PGF2α, el anticuerpo y el conjugado, se conservaron a -20°C, mientras que el resto de componentes se mantuvo en nevera a -4°C.

Previo a su procesado, es necesario acidificar la orina, para poder romper los enlaces entre los componentes lipídicos y no lipídicos. Para ello, se acidifica la orina hasta alcanzar pH = 3.0, añadiendo el equivalente a la décima parte del volumen de orina de una solución 1 Molar de ácido clorhídrico. Esta orina acidificada precisará ser diluida con tampón fosfato alcalino al 1:4, antes de proceder a realizar el test de ELISA.

Al igual que en el caso de la 8-OHdG, es preciso elaborar una curva estándar. Con este fin, disponemos de una solución estándar de 8-iso-PGF2α, con la que se preparan 8 disoluciones entre 0 y 200000 pg/ml.

Para el procesamiento de la muestra, primeramente se añaden 100 μL del anticuerpo anti-8-iso-PGF2 α a una placa cubierta con anticuerpos. Se incuba a 1 hora a 25°C, en un agitador orbital.

Cuando se complete la incubación, lavamos los pocitos con 300 μL de solución de lavado, cinco veces. Al terminar los ciclos de lavado se deben vaciar los pocillos y voltear sobre papel secante, para facilitar el secado.

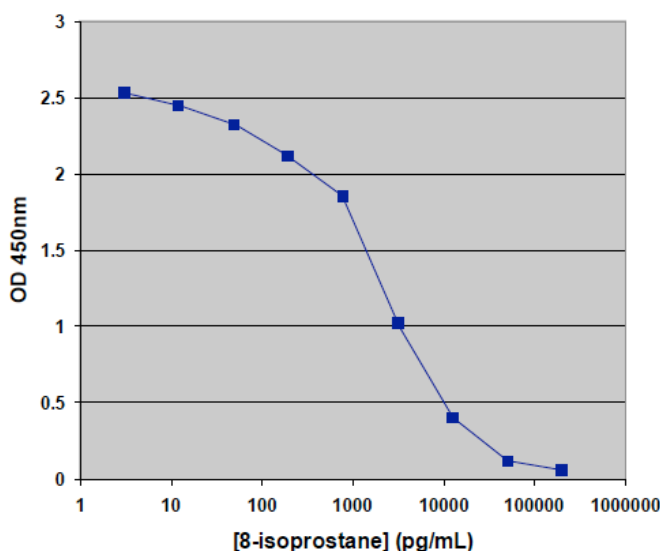
Añadimos 55 μL de la muestra o de la solución estándar y 55 μL del conjugado de 8-iso-PGF2 α a un microtubo y se mezclan bien, retirando posteriormente, 100 μL que añadiremos a cada pocillo. Incubamos en un agitador orbital, durante 1 hora a 25°C.

Se repite el proceso de lavado y se añaden 100 μL de sustrato a cada pocillo. Incubamos en agitador orbital a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Al completar la incubación del sustrato, añadimos 100 μL de fijador a todos los pocillos y se procede a la medición de la absorbancia con espectrofotómetro a 450 nm.

Figura 3.2. Curva de absorbancia estándar para el 15-F2t-Isoprostano

(Cell Biolabs, Inc)



3.6.3. Determinación de los niveles urinarios de MDA.

La técnica empleada para la medición de los niveles de Malondialdehído difiere a con la empleada con los otros marcadores. No se realizaron determinaciones mediante ELISA, sino empleando espectrofotometría para medir el índice de TBA. La medición de este índice se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído, que genera un cromógeno de coloración rojo-rosada (MDA-TBA₂), cuya absorbancia mediremos con espectrofotómetro, a 532 nm. Esta es la técnica más empleada para la determinación de los niveles de malondialdehído.

Para medir el índice de TBA se utilizó el kit comercial “*NWLSS™ Malondialdehyde Assay*”, de la casa comercial Northwest, siguiendo las indicaciones del fabricante para su uso. Esta técnica ha sido validada para la medición de MDA (118)(119)(120). Para su conservación, los elementos del kit se guardaron en nevera a 4°C.

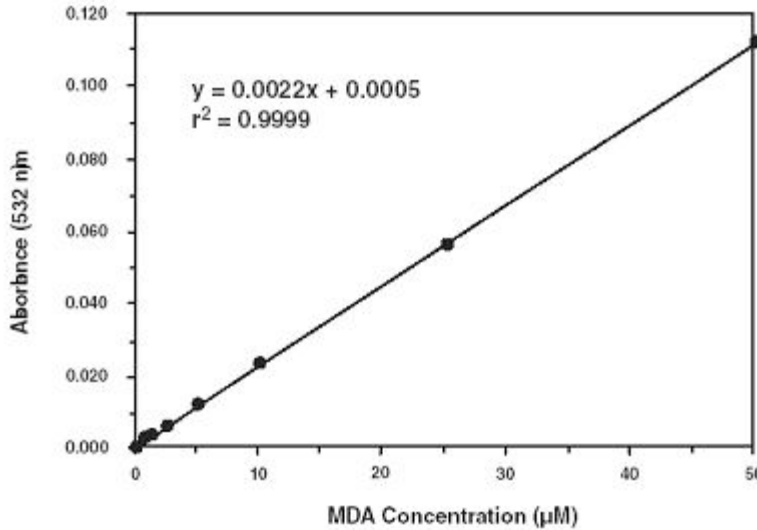
Al igual que sucede con la 8-OHdG y el isoprostano, debemos realizar una curva patrón. En este caso, las disoluciones ya están preparadas en el kit, con concentraciones que varían entre 0 y 4 µM.

Iniciamos la determinación añadiendo en un vial de microcentrífuga 10 µL del reactivo BHT (hidroxitolueno butilado). Le añadimos 250 µL de calibrador o de muestra de orina, 250 µL de reactivo ácido (provisto por el fabricante) y 250 µL del reactivo TBA. Se incuban a 60°C durante una hora, tras lo cual se centrifuga a 10000g durante 3 minutos. Se transfiere la mezcla a la cubeta y se mide la absorbancia a 532 nm.

Calculamos la absorbancia de la solución 0 molar y le restamos su valor a todas las determinaciones colorimétricas. Estos serán los valores corregidos. Se genera la curva de calibrado con los valores corregidos, con la cual obtendremos los valores de MDA. Posteriormente debemos convertir las unidades, de µM a mg/ml, para lo que debemos conocer el peso molecular del malondialdehído, que es de 72.

Figura 3.3. Curva de calibración estándar para el Malondialdehído

(Cell Biolabs, Inc)



3.6.4. Normalización de los niveles urinarios de los marcadores según la creatinina

Se ha descrito que existen variaciones, tanto individuales como temporales (hora del día a la que se recoja la muestra) en la concentración urinaria de los marcadores de estrés oxidativo, situación que puede ser problemática para la validez externa de los resultados.

Uno de los métodos más aceptados para obtener valores fiables de los niveles urinarios de estos marcadores, consiste en normalizar sus niveles de acuerdo con los valores urinarios de creatinina. Para la determinación de los valores urinarios de creatinina (mg/ml) se empleó la colorimetría, mediante un kit comercial (*Creatinine kit 555-A: SIGMA*). Este método emplea la reacción de Jaffe, que se basa en la reacción que se produce entre la creatinina y el ácido pícrico en medio alcalino, formando complejos de coloración amarillo-anaranjada. En esta coloración, además de la creatinina, participan otras sustancias inespecíficas. Para valorar cuál es la participación de la creatinina en la coloración final, se mide la intensidad de color empleando un espectrofotómetro con longitud de onda de 500 nm. Posteriormente se añade solución

ácida a la muestra (proporcionada por el fabricante, consiste en una solución que contiene ácido sulfúrico y ácido acético). Este proceso destruye la creatinina presente en la muestra. Se vuelve a medir la intensidad de la coloración a 500 nm y se calcula la diferencia, que representa la participación de la creatinina en dicha coloración, comparándose este valor con curvas estándar, para determinar las cifras de creatinina.

Una vez determinada la concentración urinaria de creatinina, se empleó para normalizar los valores de los marcadores, en cada paciente, mediante la fórmula:

$$\text{Marcador (ng/mg creatinina)} = \text{Marcador (ng/ml)} / \text{Creatinina (mg/ml)}$$

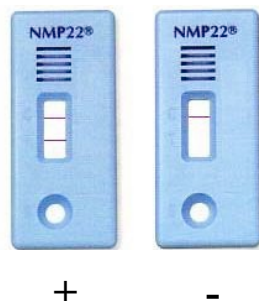
3.7. CITOLOGÍA URINARIA

Se remitió una parte de la muestra de orina para el estudio patológico de la misma (citología urinaria). La citología de orina constituye el método diagnóstico patológico no invasivo más empleado en la actualidad, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los pacientes. La muestra fue remitida en fresco al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

3.8. NMP22

La determinación mediante test comercial de la “Nuclear Matrix Protein 22” (NMP22), se realizó usando el Alere NMP22[®] BladderChek[®], kit de inmunoensayo para la detección cualitativa de NMP-22. Para su uso se vierten 4 gotas de orina sobre el test diagnóstico que presenta una ventana “control” y otra “test”. Se deben esperar 30 minutos, tras los cuales el test se revelará como positivo o negativo.

Figura 3.4. Imagen de Alere Bladder Check. Test positivo y negativo
(www.geminidiagnostica.it)



3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como señalamos en el apartado pertinente, el objetivo principal de este estudio es aplicar la metodología estadística necesaria para determinar si existe diferencia en los niveles séricos de los biomarcadores de estrés oxidativo (15-F2t-Isoprostano, MDA y 8-OHdG) entre los pacientes afectos de tumor vesical de nuestra población y los individuos sanos del grupo control, estudiando el comportamiento de dichos marcadores una vez se ha conseguido la resección quirúrgica tumoral. Las variables respuesta principales son, por tanto, los niveles urinarios de los biomarcadores reseñados.

Como objetivos secundarios de este estudio, intentamos determinar la influencia de los diferentes parámetros clínicos relacionados con situaciones de estrés oxidativo y su influencia en los niveles de nuestros biomarcadores, así como estudiar el papel que desempeñan los diferentes parámetros patológicos tumorales en dichos marcadores.

Los análisis estadísticos se realizaron en función de la naturaleza estadística de las diferentes variables, utilizando las pruebas estadísticas habituales y específicas en función de las hipótesis a resolver.

En primer lugar se llevó a cabo un análisis exploratorio de todas las variables incluidas en el presente estudio, resumiendo sus valores mediante las correspondientes tablas de frecuencias para las variables categóricas y los principales estadísticos de resumen para las variables cuantitativas. Las variables categóricas se expresan como

valor absoluto (porcentaje). Como medidas de localización de las variables cuantitativas se han utilizado las medias, mientras que como medidas de dispersión se han empleado las desviaciones típicas. También se han utilizado gráficas para resumir las principales variables de interés, seleccionando aquellas más adecuadas según la naturaleza de las variables objeto de estudio.

La comparación de variables cuantitativas, cuando sólo existen dos grupos de estudio, se realizó mediante la prueba estadística de la *t de Student* de comparación de medias (apareada en el caso del estudio intra-paciente o independiente en el caso del estudio inter-paciente) o su correspondiente no paramétrica (U de Mann-Whitney, Wilcoxon).

Se realizó una valoración estadística de la comparabilidad de más de 2 grupos de estudio por medio de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con la correspondiente prueba de comparación múltiple de medias “post-hoc” (Bonferroni). Asimismo, cuando las variables en estudio no se ajustaban a una distribución normal o se violaban los supuestos del análisis paramétrico, se utilizó el test de Kruskal-Wallis para comparaciones entre más de 2 grupos.

Para estudiar si los datos de naturaleza cuantitativa siguen la distribución normal se ha utilizado la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*, así como la prueba de *Shapiro-Wilk* cuando el número de casos es inferior a 30.

Las variables de tipo porcentaje por grupo de tratamiento se contrastaron mediante la prueba estadística binomial de comparación de 2 proporciones para cada una de las respuestas obtenidas cuando hubo más de 2 respuestas y cuando hubo 2 respuestas con la prueba de *chi cuadrado* o mediante la prueba de *Fisher*.

Se calculó la precisión diagnóstica de la Citología Urinaria y del NMP22 en la muestra (Sensibilidad, Especificidad, Tasa de verdaderos/Falsos positivos/negativos).

Se validó la rentabilidad diagnóstica de los diferentes marcadores de estrés oxidativo mediante la estimación del área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para valorar la discriminación. Este área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminatoria diagnóstica. Siempre se elige la prueba diagnóstica que presente un mayor área bajo la curva. Se han establecido los siguientes intervalos para los valores de AUC: De 0.5-0.6: Test malo. De 0.6-0.75: Test regular. De 0.75-0.9: Test bueno. De 0.9-0.97: Test muy bueno. De 0.97-1: Test excelente. Para calcular el punto de corte óptimo en la curva de rendimiento diagnóstica se empleó el Índice de Youden

(también llamado *estadístico J de Youden*). Este estadístico, introducido por W.J. Youden en 1950, permite valorar la precisión diagnóstica de un punto dado de la curva, variando su valor entre 0 y 1. Un índice de Youden de 0 significa que el test tiene la misma tasa de positivos en el grupo de enfermos y no enfermos, por lo que se considera que el test no es útil. Por el contrario, un índice de Youden de 1 significa que no hay falsos positivos ni falsos negativos, por lo que el test es perfecto. Este índice se calcula buscando el punto de la curva que de un a puntuación superior según la fórmula:

$$J = \text{Sensibilidad} - (1 - \text{Especificidad})$$

En todos los contrastes de hipótesis realizados se consideró que el resultado era estadísticamente significativo cuando el correspondiente p-valor era inferior a 0,05.

Para realizar los diferentes cálculos y análisis estadísticos se empleó el programa SPSS[®] 17.0 para Windows[®] (IBM[®] Corporation, Nueva York, Estados Unidos).

3.10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

La búsqueda bibliográfica se realizó mediante sistemas de Internet, recogidas por la National Library of Medicine (U.S. Department of Health & Human Services), a través del servicio PubMed “on-line”, sistema que indexa recoge más de 25 millones de citaciones de MEDLINE desde mediados de la década de 1960. Las referencias bibliográficas se añadieron al texto empleando el gestor de citas bibliográficas Mendeley, en su versión 1.14. Como formato de las citas se siguieron las normas de Vancouver.

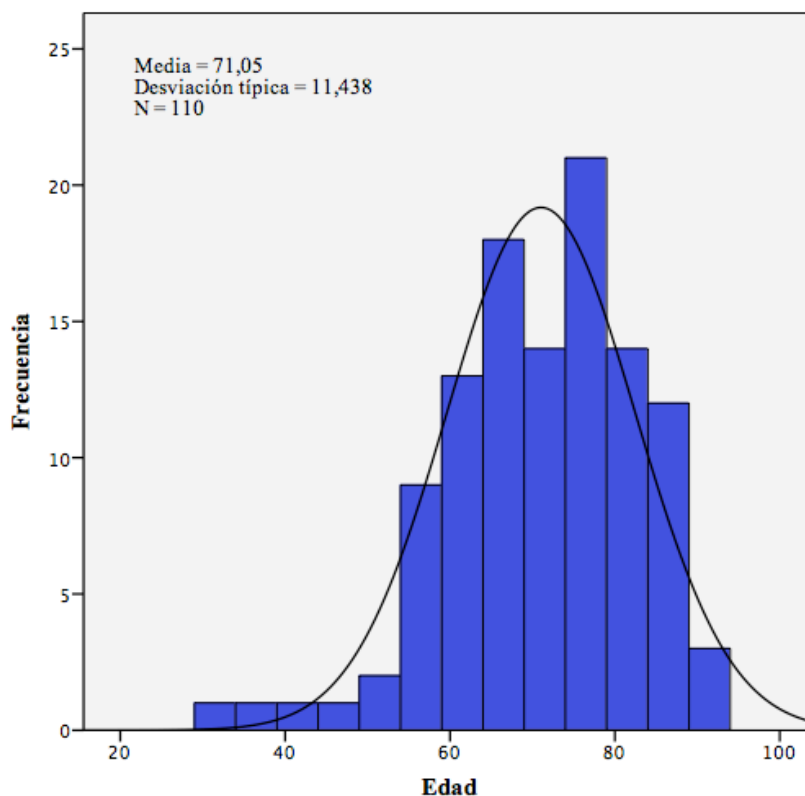
IV. RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

4.1.1. Características demográficas de la población muestral

Los datos utilizados en la presente Tesis proceden de un estudio de casos y controles en el que participaron 110 personas, incluidas entre Noviembre de 2008 y Noviembre de 2010, con edades comprendidas entre los 26 y 92 años. En la figura 4.1 se aprecia la distribución de la edad en la población de estudio, en el momento de la recogida de la muestra de orina.

Figura 4.1. Distribución de edad de la población muestral



Se incluyeron como *casos* pacientes que presentaban tumor vesical y como *controles*, pacientes que no tenían antecedentes de ninguna patología tumoral, ni padecían enfermedades activas en el momento del estudio. Al final del estudio se incluyeron 69 pacientes como *casos* y 41 pacientes como *controles*, con una distribución según sexo y edad como se muestra en las figuras 4.2 y 4.3.

Figura 4.2. Distribución de la edad en el momento de la recogida de muestra según grupo de estudio.

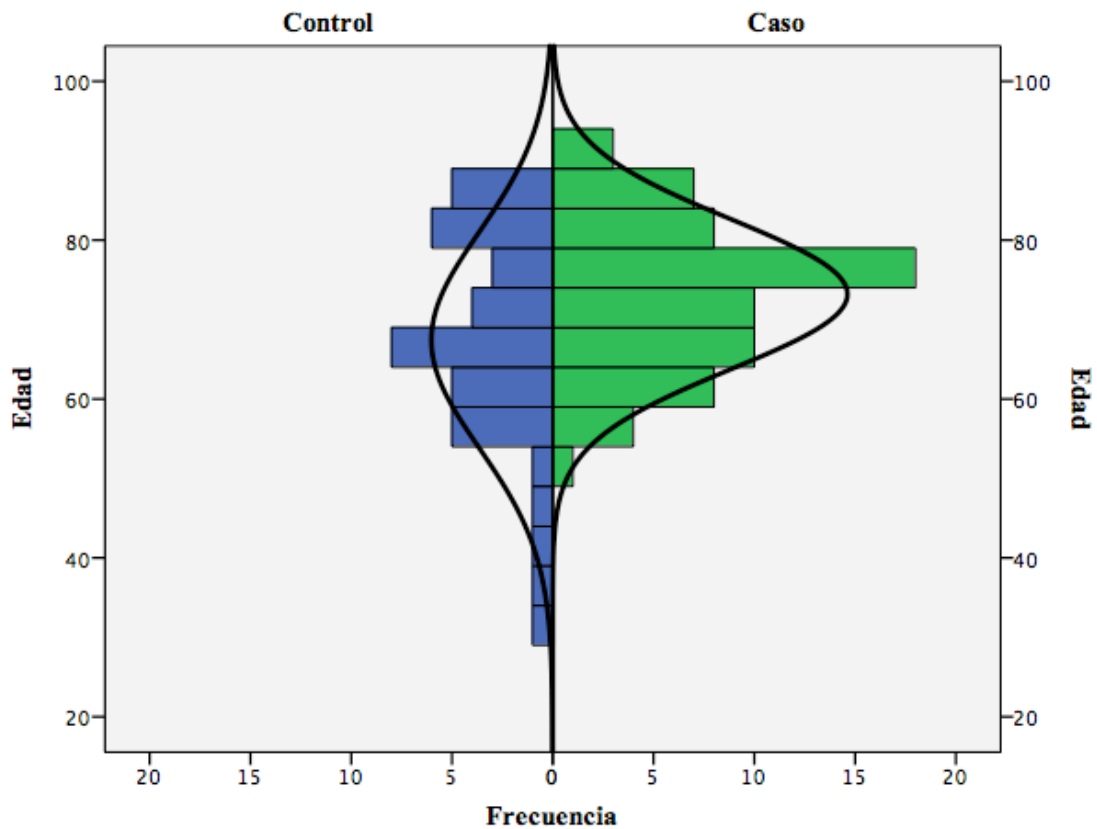
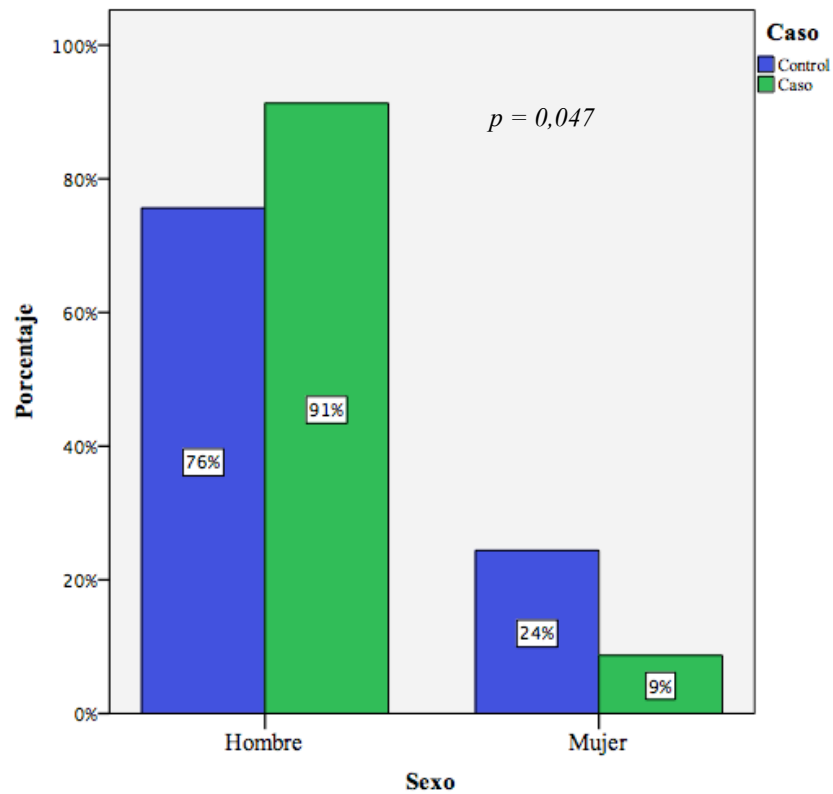
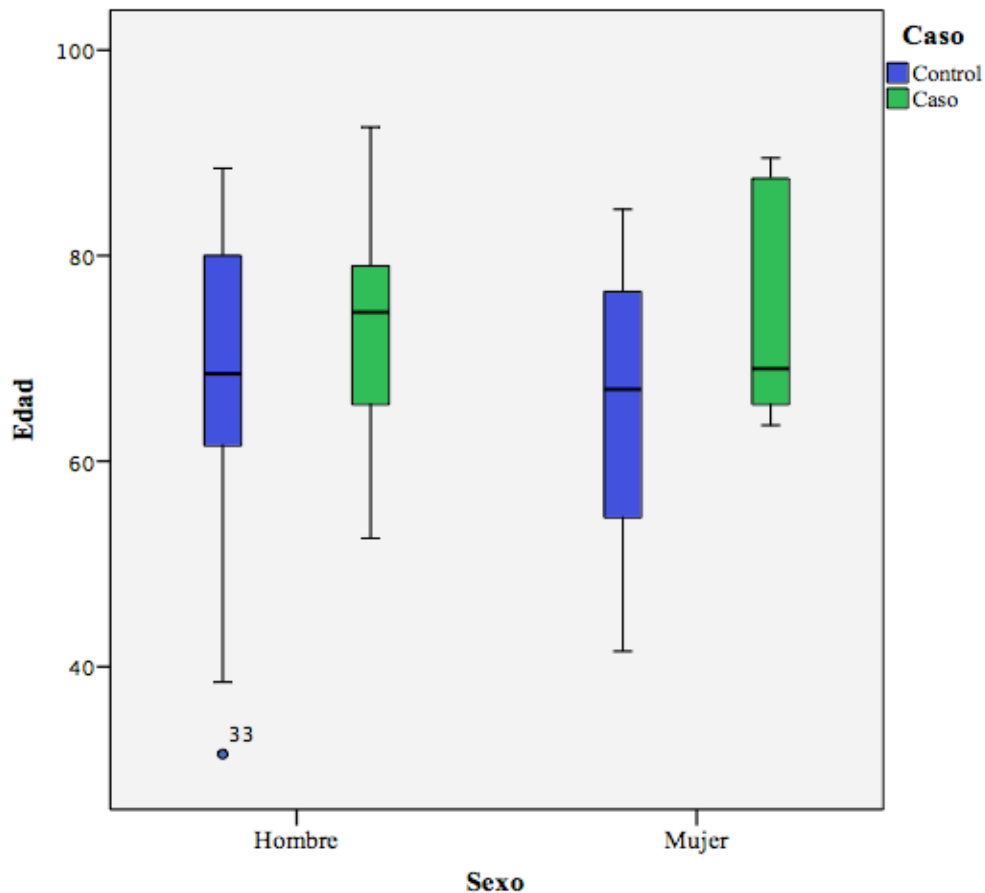


Figura 4.3. Distribución de la población muestral según sexo

La media de edad para el grupo de casos fue de 73,2 años (DT: 9,4 años), y para el grupo de controles de 67,43 años (DT: 13,6 años), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,01$)

En cuanto a la distribución por sexos, el grupo de casos estaba compuesto por un 91% de hombres y un 9% de mujeres, y el grupo de controles por un 76% de hombres y un 24% de mujeres, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,047$).

Figura 4.4. Diagrama de cajas para la variable edad por sexos según el grupo de estudio

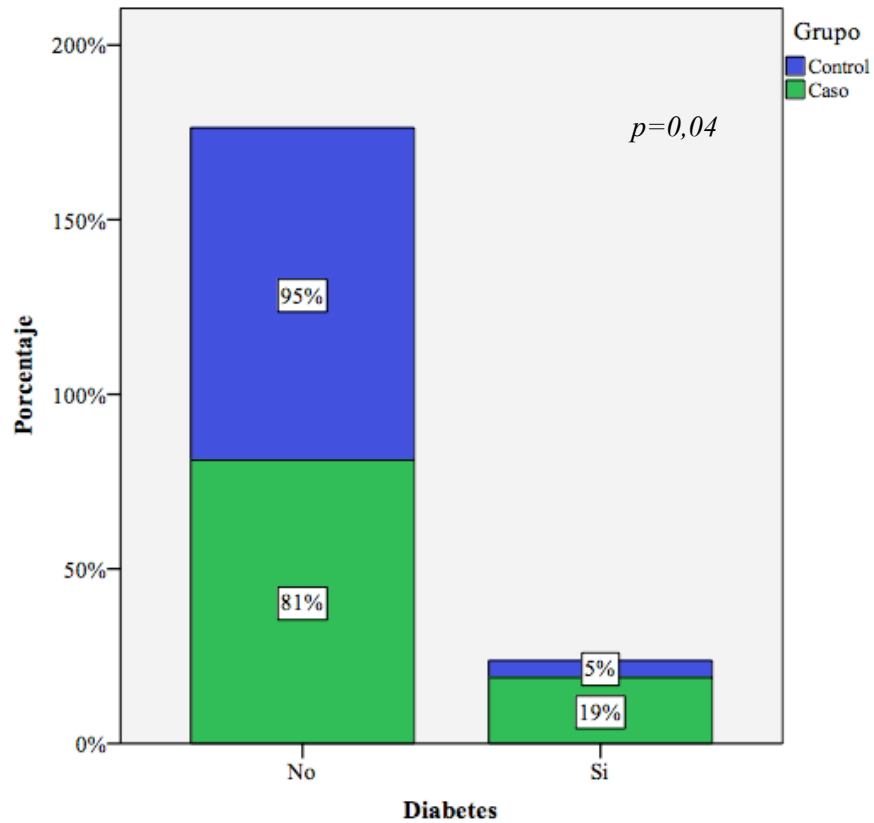
4.1.2. Características clínicas de la población muestral

Las variables clínicas recogidas se resumen en la tabla 4.1. Como se puede apreciar en dicha tabla, estas variables se distribuyeron de manera homogénea entre los grupos de casos y controles, encontrándose únicamente diferencias significativas en la proporción de pacientes diabéticos, siendo ésta del 18,8% en el grupo de casos y del 4,9% en el grupo control ($p=0,04$). (Figura 4.5)

Tabla 4.1. Características de la muestra según grupo de estudio

		Controles		Casos		p-valor
		n	%	n	%	
Hipertrigliceridemia	No	39	95	67	97	p=0,63
	Si	2	5	2	3	
Hipercolesterolemia	No	31	76	46	67	p=0,39
	Si	10	24	23	33	
Hipertensión	No	34	83	46	67	p=0,08
	Si	7	17	23	33	
Diabetes	No	39	95	56	81	p=0,04
	Si	2	5	13	19	
Cardiopatía	No	39	95	63	91	p=0,71
	Si	2	5	6	9	
Insuficiencia renal crónica	No	39	95	66	96	p=0,65
	Leve	2	5	3	4	

Como se ha señalado con anterioridad, además de las variables clínicas expresadas en la tabla 4.1, se exploró en la historia clínica de los pacientes, la presencia de hepatopatía, alcoholismo, alteraciones tiroideas, y enfermedades autoinmunes, no encontrándose en los sujetos del estudio ningún caso.

Figura 4.5. Proporción de pacientes diabéticos según grupo de estudio

Se recogió el antecedente de tabaquismo, el número de cigarrillos/día consumidos y los años que se llevaba fumando, sin encontrarse diferencias entre los grupos (Tabla 4.2)

Tabla 4.2. Distribución del hábito tabáquico según grupo de estudio

		Control		Caso		p-valor
		n	%	n	%	
Fumador	No	24	59	40	58	p=1
	Si	17	41	29	42	
	Total	41	100	69	100	
Cigarrillos/Día	<10	24	59	39	57	p=0,233
	10-20	5	12	2	3	
	>1 paquete	12	29	28	40	
	Total	41	100	69	100	

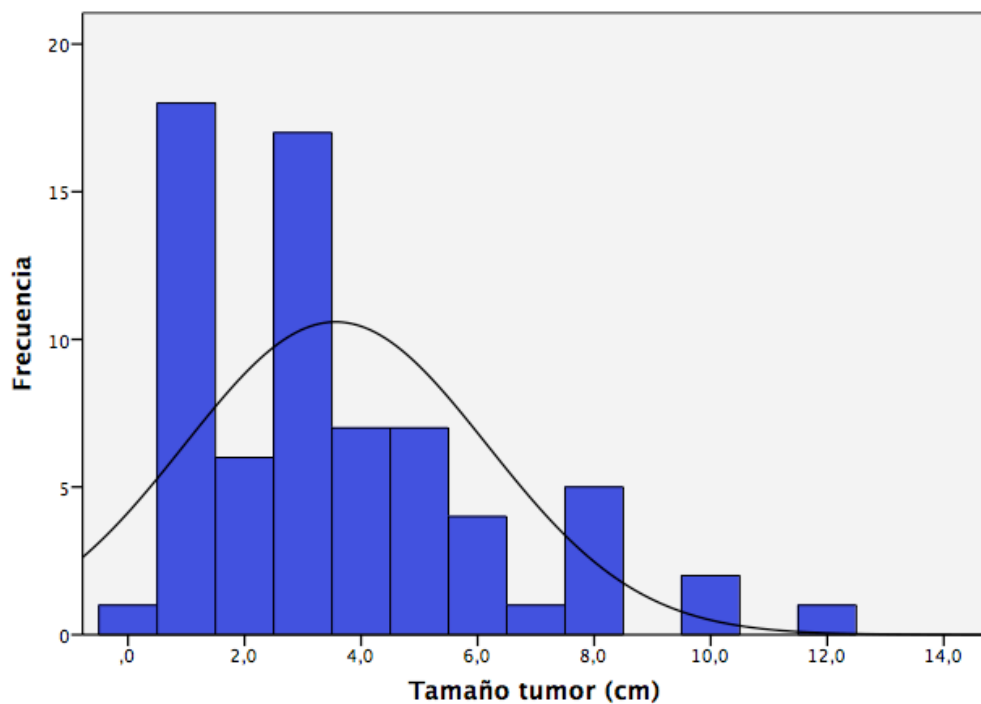
4.1.3. Características patológicas del grupo de casos

En el grupo de casos, compuesto por pacientes afectados por tumor vesical, se estudiaron las características patológicas y clínicas de los tumores: tamaño tumoral (Figura 4.5), número de tumores, estadio y gradación histológica (Tabla 4.3) El hallazgo clínico más frecuente, en cuanto al número de tumores presentes, fue la presencia de un tumor único (81,2%); la media de tamaño tumoral fue de 3,6 cm (DT: 2,6 cm). El estadio patológico más frecuente fue pTa (52,2%), siendo el grado de diferenciación histológica predominante los tumores de alto grado (G3 según la clasificación de la OMS de 1973) con un 37,7% de los casos.

Tabla 4.3. Características patológicas de los casos

		n	%	Media	DT
Tamaño tumoral		-	-	<i>3.6 cm</i>	<i>2.6</i>
Estadio	pTa	36	52,2%		
	pT1	33	47,8%		
	Total	69	100,0%		
Grado	G1	19	27,5%		
	G2	24	34,8%		
	G3	26	37,7%		
	Total	69	100,0%		
Numero de tumores	1	56	81,2%		
	2	9	13,0%		
	3	2	2,9%		
	4	2	2,9%		
	Total	69	100,0%		

Figura 4.6. Histograma del tamaño tumoral en el grupo de casos



4.2. ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Se midieron los niveles urinarios de 8-OHdG, 15-F2t-Isoprostano y de MDA tanto en los controles como en los casos, determinándose en este segundo grupo antes de la cirugía y un mes después de la misma.

Los niveles de los diferentes marcadores están normalizados de acuerdo a la creatinina del paciente, y están expresados en nanogramos/mg de creatinina.

Como se muestra en las figuras 4.7, 4.8 y 4.9, se comprueba que los niveles de malondialdehído y de isoprostano son mayores en el grupo de casos con respecto al de los controles y que, una vez intervenidos (resección transuretral de tumor vesical), los niveles tienden a igualarse con el grupo control. En el caso de la 8-OHdG, el comportamiento es el contrario, detectándose el nivel más bajo en el grupo de casos antes de la cirugía.

Figura 4.7. Niveles de 15-F2t-Isoprostano según grupo de estudio.

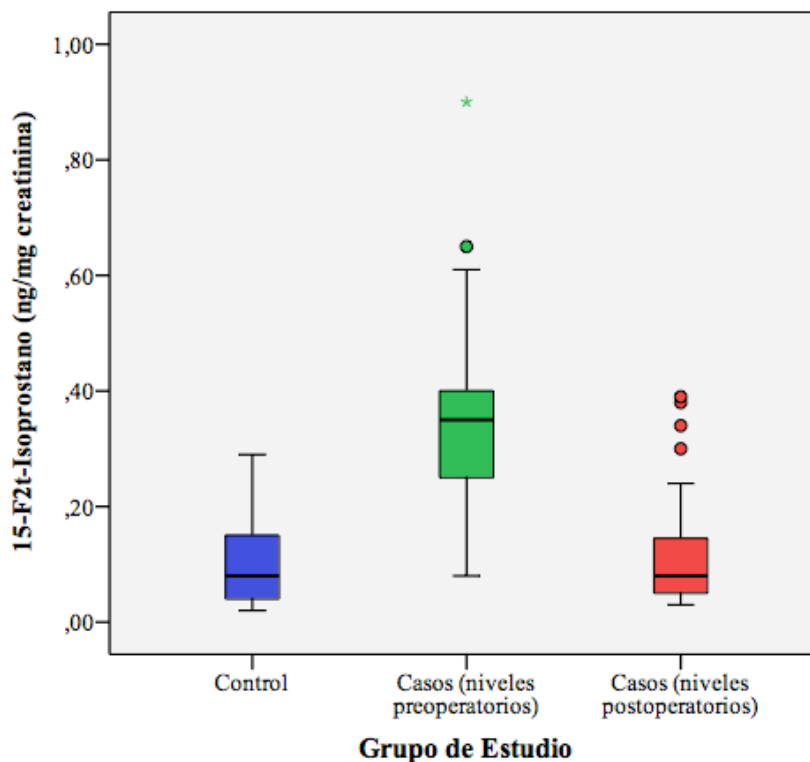


Figura 4.8. Niveles de MDA según grupo de estudio

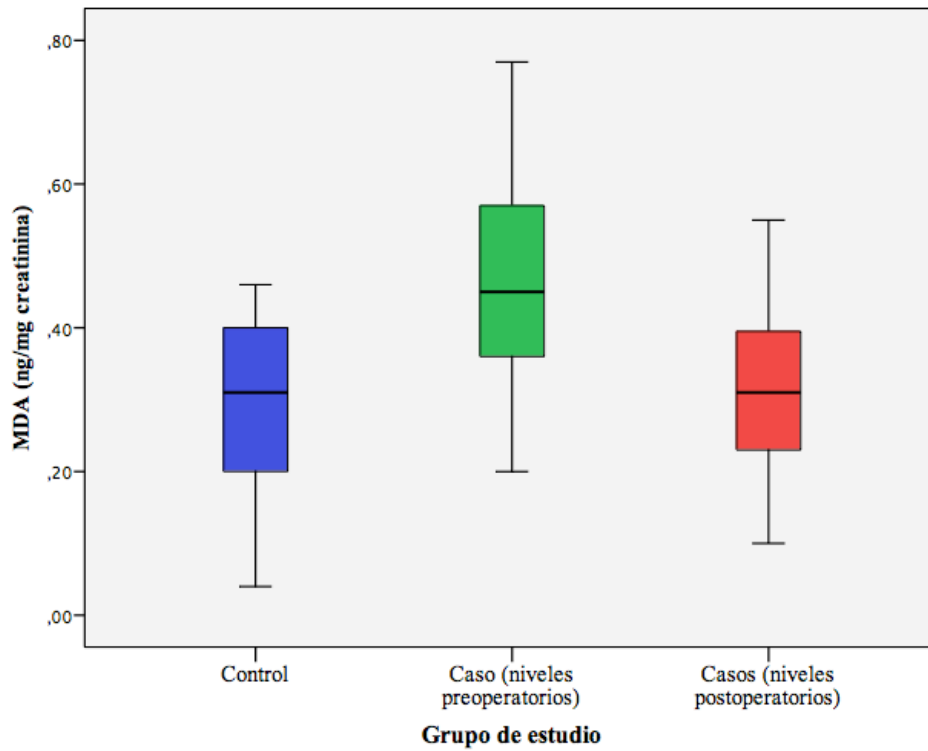
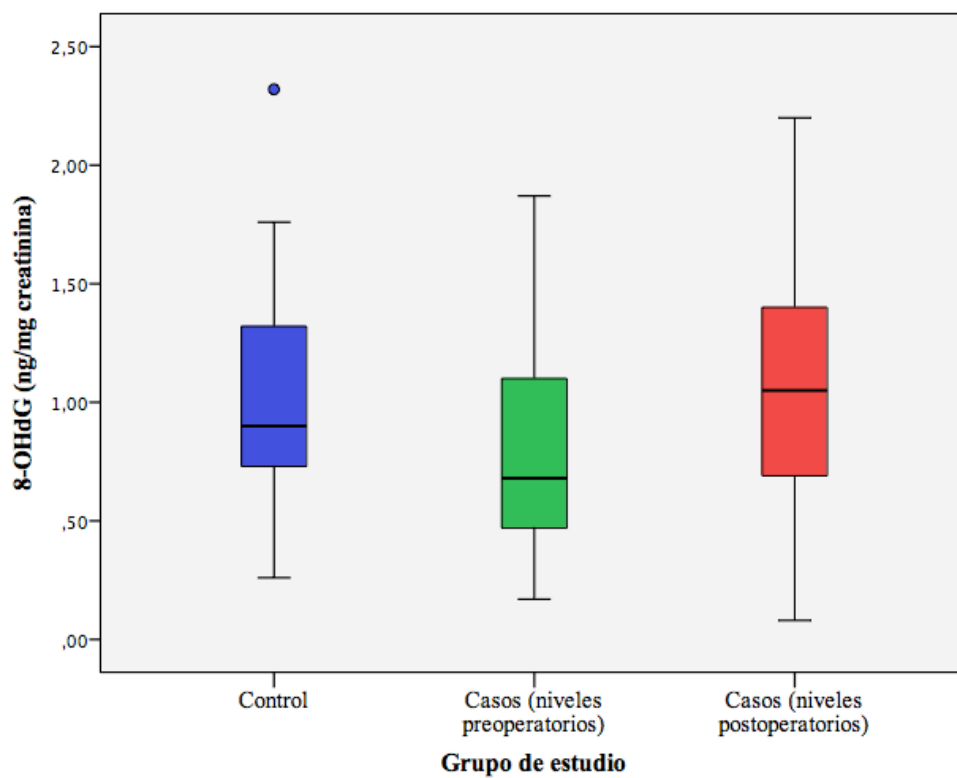


Figura 4.9. Niveles de 8-OHdG según grupo de estudio



Se comprobó que los niveles de los marcadores de estrés oxidativo, como variables cuantitativas continuas, seguían una distribución normal, empleando para ello el test de Kolmogórov-Smirnov. Se realizó una comparación de medias empleando el test T de Student para muestras independientes (para la comparación entre los niveles de biomarcadores entre el grupo de casos y el de controles) y T de Student para muestras relacionadas (para los niveles de los biomarcadores en el grupo de casos antes y después de la cirugía), encontrándose todas estadísticamente significativas. (Tablas 4.4 y 4.5 respectivamente)

Tabla 4.4. Comparación de los niveles de los marcadores según grupo de estudio

	Grupo de estudio	N	Media (ng/mg creatinina)	Desviación típica	p-valor
8-OHdG	Control	41	1,0151	,4217	<i>p=0,015</i>
	Caso	69	,8045	,4402	
15-F2t-Isoprostano	Control	41	,0981	,0692	<i>p<0,01</i>
	Caso	69	,3457	,1449	
MDA	Control	41	,2773	,1342	<i>p<0,01</i>
	Caso	69	,4567	,1455	

Tabla 4.5. Comparación de niveles de los marcadores antes y después de la cirugía

	Grupo de estudio	Media (ng/mg creatinina)	Desviación típica	p-valor
8-OHdG	Pre cirugía	,8045	,4627	<i>p<0,01</i>
	Post-cirugía	1,0435	,4402	
15-F2t-Isoprostano	Pre-cirugía	,3457	,1449	<i>p<0,01</i>
	Post-cirugía	,1235	,1049	
MDA	Pre-cirugía	,4567	,1455	<i>p<0,01</i>
	Post-cirugía	,3177	,0996	

En el estudio de las variaciones intra-individuo tras la cirugía (RTU de tumor vesical), intervinieron 31 individuos, lo que supone un 45,5% del total de pacientes del grupo de casos (55,5% de valores perdidos)

Tabla 4.5. Comparación de niveles de los marcadores entre los controles y los casos tras la cirugía (post IQx)

	Grupo de estudio	Media (ng/mg creatinina)	Desviación típica	p-valor
15-F2t-Isoprostano	Control	0,981	0,069	p=0,22
	Caso Post-IQx	0,123	0,104	
MDA	Control	0,277	0,134	p=0,164
	Caso post IQx	0,317	0,099	
8-OHdG	Control	1,015	0,423	p=0,79
	Caso Post-IQx	1,014	0,499	

La tabla 4.5 nos muestra el comportamiento de los marcadores tras la cirugía resectora del tumor, apreciándose cómo los niveles descienden igualándose a los niveles que presentan los pacientes del grupo de controles. En el caso de la 8-OHdG, se aprecia un ascenso de los niveles, igualándose también con el grupo de controles.

4.2.1. Análisis de los posibles factores de confusión

4.2.1.2. Análisis inter-sujetos (casos vs controles)

Al realizar el análisis univariante se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la media de edad, distribución por sexos y proporción de pacientes diabéticos entre el grupo de casos y el de controles. Se analizó el efecto de estos

factores en estas diferencias encontradas entre los niveles de los biomarcadores entre el grupo de casos y el de controles.

Se exploró la relación del tabaquismo con los niveles de los diferentes marcadores, tanto considerando la presencia de hábito tabáquico o no, como considerando el número de cigarrillos/día consumidos, sin encontrarse diferencias relacionadas con estas variables para ninguno de los marcadores estudiados. (Figuras 4.10 y 4.11)

Figura 4.10. Niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo según tabaquismo

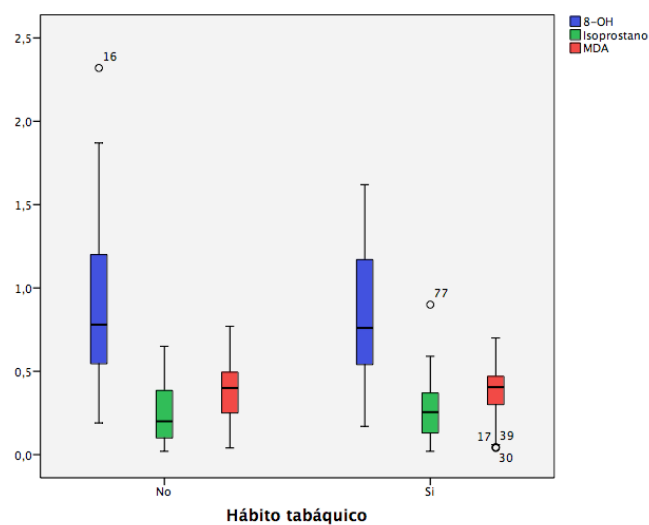
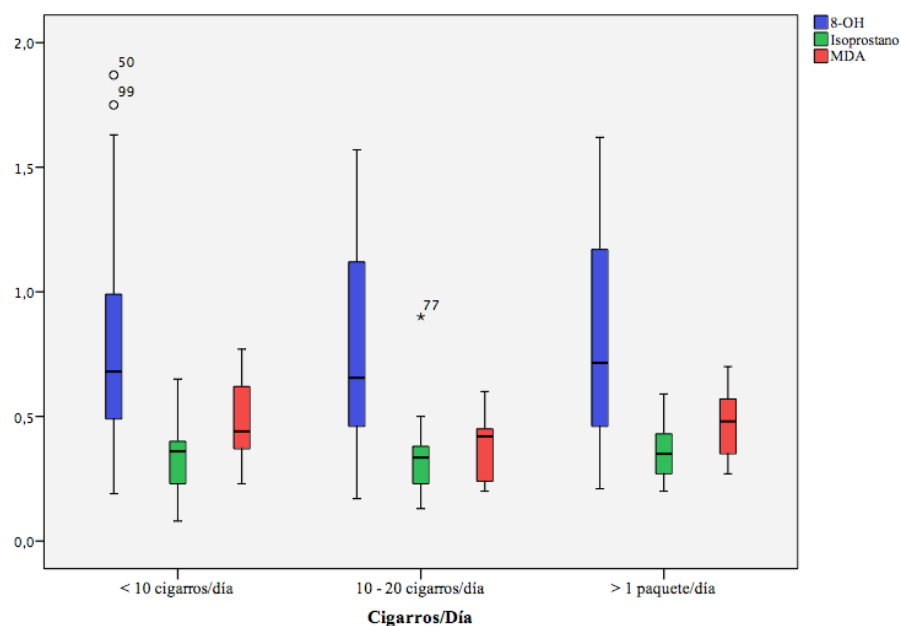
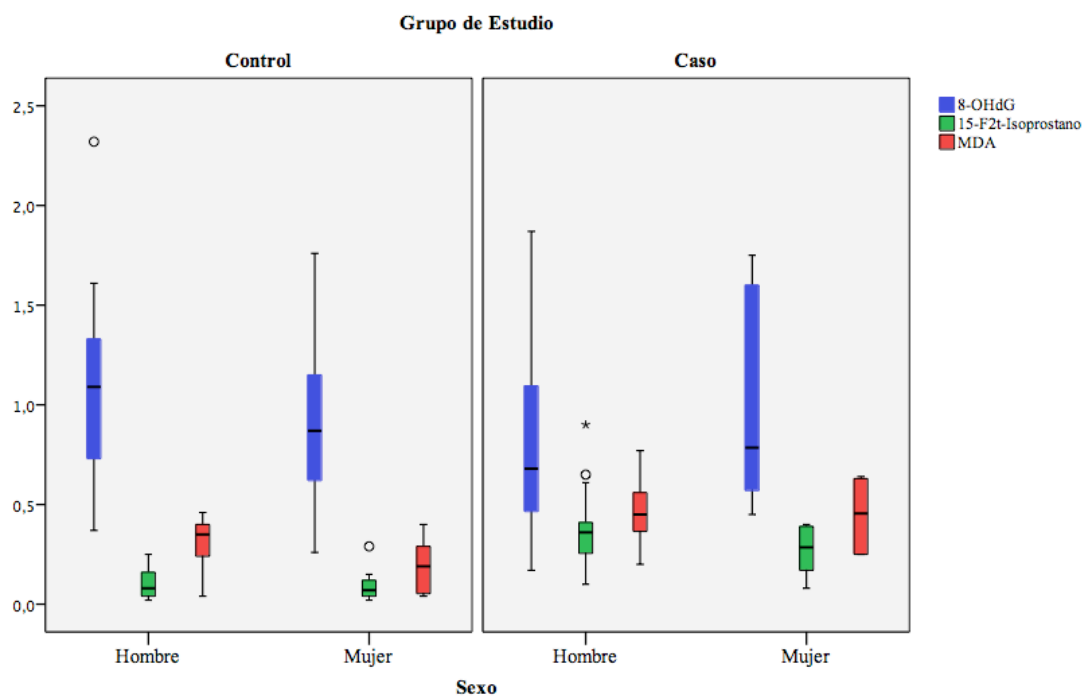


Figura 4.11. Niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo según consumo de tabaco



Se valoró el papel que desempeñaba el sexo en los valores de los marcadores de estrés oxidativo (Figura 4.12) Si bien se encontraron diferencias en la distribución de acuerdo al sexo entre los grupos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de los marcadores, entre el grupo de casos y el de controles, atendiendo a esta variable.

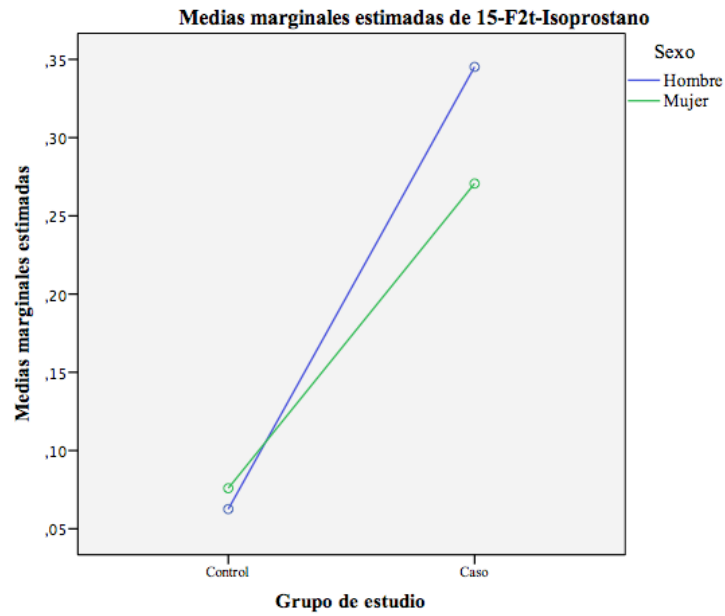
Figura 4.12. Niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo según grupo de estudio y sexo



Para valorar las diferencias en los niveles de los marcadores de estrés oxidativo entre el grupo de casos y el de controles se utilizó el modelo lineal general univariante para el análisis de la varianza, homogeneizado según edad, sexo y presencia de diabetes. Al realizar el análisis multivariante hubo problemas dado la baja proporción de pacientes diabéticos y de mujeres, de tal manera que, al estratificar en grupos según grupo de estudio y sexo y presencia o no de diabetes, quedaban categorías vacías, por lo que se desestimó el análisis multivariante y se procedió a realizar análisis univariante homogeneizado por la edad.

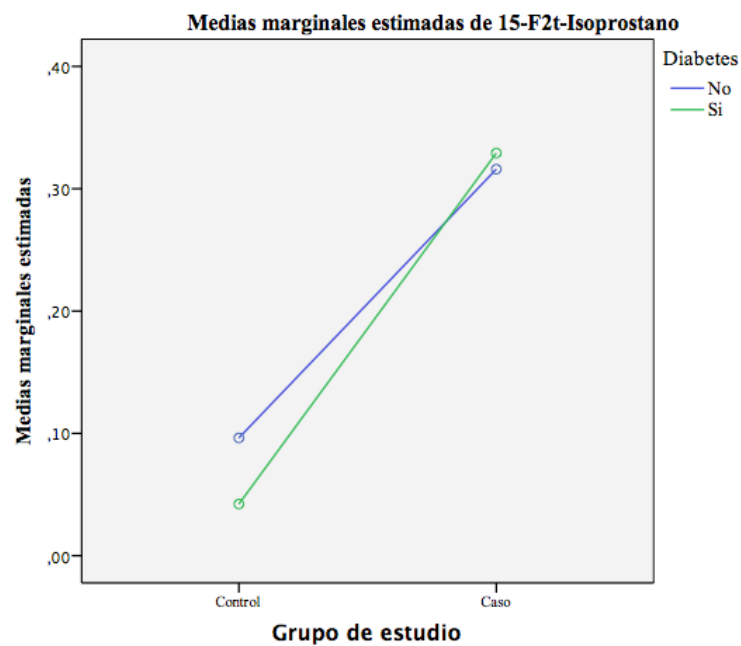
Las figuras 4.13– 4.18 muestran el comportamiento de los marcadores para una edad de 71,05 años (seleccionada por el modelo de análisis estadístico empleado y que representa a la media de edad de la población).

Figura 4.13. Niveles de 15-F2t-Isoprostano según grupo de estudio y sexo homogeneizado por la edad



Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los siguiente valores: Edad = 70,55

Figura 4.14. Niveles de 15-F2t-Isoprostano según grupo de estudio y presencia de diabetes homogeneizado por la edad



Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los siguiente valores: Edad = 70,55

Figura 4.15. Niveles de MDA según grupo de estudio y sexo homogeneizados por la edad

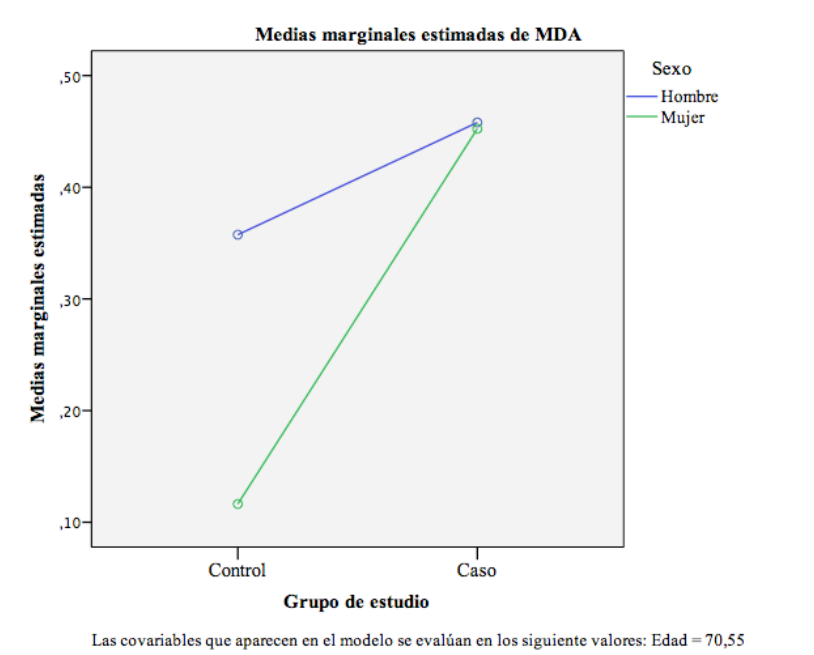


Figura 4.16. Niveles de MDA según grupo de estudio y presencia de diabetes homogeneizado por la edad

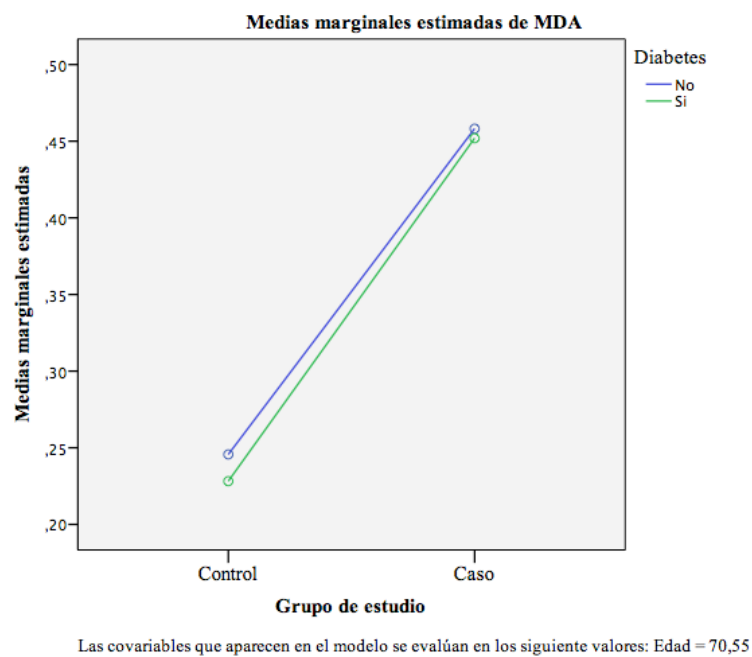
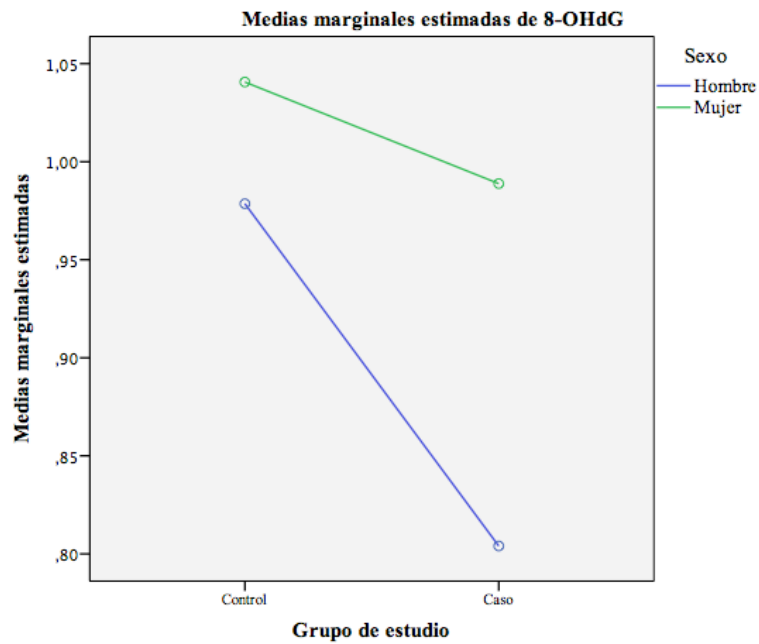
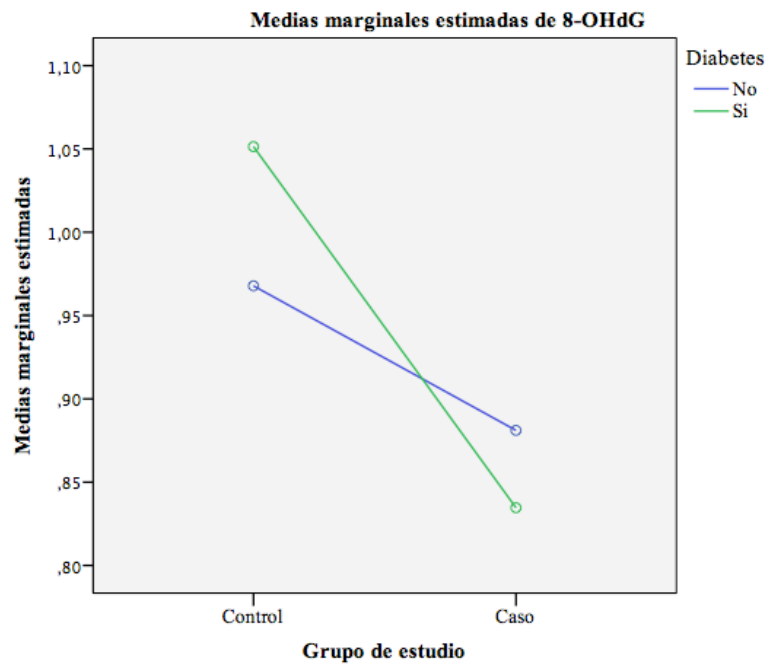


Figura 4.17. Niveles de 8-OHdG según grupo de estudio y sexo homogeneizado por la edad



Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los siguiente valores: Edad = 70,55

Figura 4.18. Niveles de 8-OHdG según grupo de estudio y presencia de diabetes homogeneizado por la edad



Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los siguiente valores: Edad = 70,55

-15-F2t-Isoprostano: se puede comprobar en las figuras 4.13 y 4.14 como los niveles de Isoprostanos son más elevados en el grupo de casos que en de los controles, independientemente de su agrupación por sexo o por estatus diabético. Se aprecian niveles superiores en los hombres en el grupo de casos, presentando una media de 0,353 ng/mg de creatinina frente a las mujeres, que presentan una media de 0,268 ng/mg de creatinina, sin que esta diferencia sea estadísticamente significativa ($p=0,702$). En el caso de la diabetes, no se aprecian diferencias entre los pacientes diabéticos y no diabéticos

- Malondialdehído (MDA): al igual que sucede con el 15-F2t-Isoprostano, se comprueba en las figuras 4.15 y 4.16 como los niveles de MDA son superiores en el grupo de casos que en el de controles, independientemente del sexo y de la presencia o no de diabetes. En este caso, se aprecian niveles muy superiores de MDA en los varones en el grupo de controles, presentando una media de 0,3046 ng/mg de creatinina en hombres frente a 0,1927 ng/mg de creatinina en mujeres, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,036$), pero ambos valores se igualan en el grupo de casos, alcanzando ambos sexos valores superiores en este grupo respecto al grupo de controles. En cuanto a la presencia de diabetes, no se aprecian diferencias entre el grupo de diabéticos – no diabéticos.

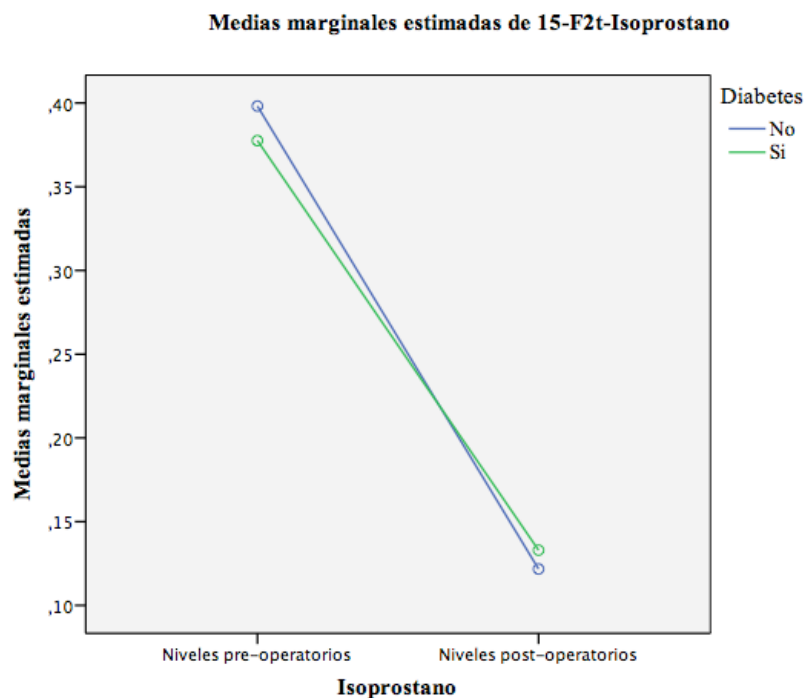
- 8-hidroxi-d-Guanosina (8-OHdG): el comportamiento de este marcador es el opuesto al de los otros dos, tal como habíamos visto previamente. (Figuras 4.17 y 4.18) En este caso, los niveles de 8-OHdG son inferiores en el grupo de casos frente al de controles, sin que este comportamiento se modifique ni por el sexo ni por el estatus diabético. Sí que podemos apreciar que los niveles en varones son inferiores que los de mujeres, en el grupo de casos, sin que esta diferencias sea estadísticamente significativa. Así, los valores medios ajustados por edad en el grupo de controles son de 0,787 ng/mg de creatinina para los varones y de 0,99 ng/mg de creatinina para las mujeres ($p=0,3$). En cuanto a la diabetes, tampoco se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, pudiendo señalar únicamente una mayor diferencia entre los casos y los controles en el grupo de diabéticos.

4.2.1.2. Análisis intra-sujetos (valores preoperatorios y postoperatorios)

Para valorar las diferencias en los niveles de los marcadores de estrés oxidativo en el grupo de casos entre los niveles pre y postoperatorios se utilizó el modelo lineal general para medidas repetidas para el análisis de la varianza, homogeneizado según edad, sexo y presencia de diabetes. En este caso, la muestra cuenta sólo con 31 individuos, debido a los valores perdidos por muestras no entregadas. En este caso comprobamos que tan sólo existía una mujer que hubiera entregado las dos muestras, por lo que los cálculos se realizaron sólo para los hombres.

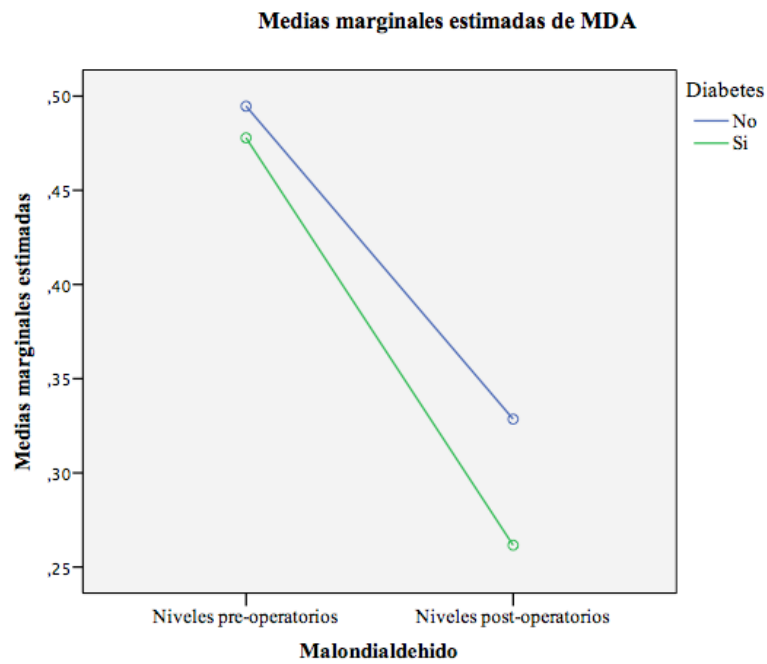
Las figuras 4.19, 4.20 y 4.21 muestran el comportamiento de los marcadores para una edad de 71,42 años (seleccionada por el modelo de análisis estadístico empleado y que representa a la media de edad del grupo de casos).

Figura 4.19. Niveles pre y postoperatorio de Isoprostanos según presencia de diabetes homogeneizados por la edad



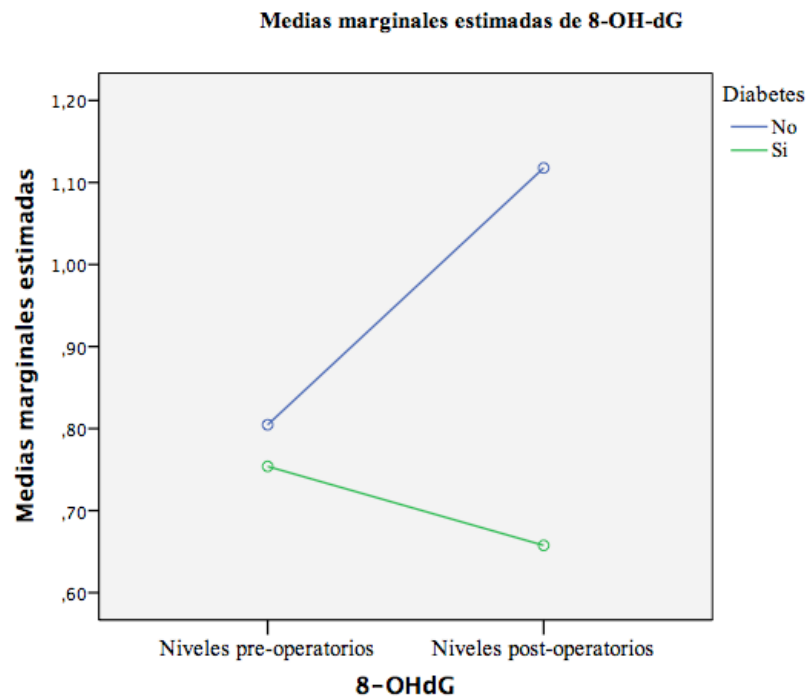
Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los siguiente valores: Edad = 71,42

Figura 4.20. Niveles pre y postoperatorios de MDA según presencia de diabetes homogeneizados por la edad



Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los siguiente valores: Edad = 71,42

Figura 4.21. Niveles pre y postoperatorios de 8-OHdG según presencia de diabetes homogeneizados por la edad



Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los siguiente valores: Edad = 71,42

En el caso del 15-F2t-Isoprostano y del MDA, se aprecian unos niveles urinarios superiores en el grupo de casos antes de la intervención quirúrgica, produciéndose un descenso de estos niveles tras la intervención, independientemente de la presencia o no de diabetes.

El comportamiento de la 8-OH-dG es el contrario al de estos marcadores, observándose niveles inferiores en los pacientes antes de la intervención y elevándose tras la misma. En este caso, se aprecian diferencias significativas en los niveles urinarios postoperatorios de este marcador entre el grupo de diabéticos y no diabéticos, siendo la media de 1,103 ng/mg de creatinina para los no diabéticos y de 0,687 ng/mg de creatinina para los diabéticos ($p=0,03$)

4.2.2.- Valoración de factores patológicos

Se estudiaron las diferencias de los niveles urinarios de los marcadores en el grupo de casos (pacientes con tumor vesical) atendiendo a los diferentes parámetros clínico-oncológicos (número de tumores, tamaño tumoral, grado histológico, estadio tumoral).

Las figuras 4.22, 4.23 y 4.24 muestran los niveles de los diferentes marcadores de acuerdo al estadio clínico y la figura 4.25 muestra los valores según estadio patológico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al separar a los casos según el estadio patológico, ni según grado histológico. Tampoco se asoció el número o el tamaño tumoral con diferencias significativas en los marcadores de estrés oxidativo.

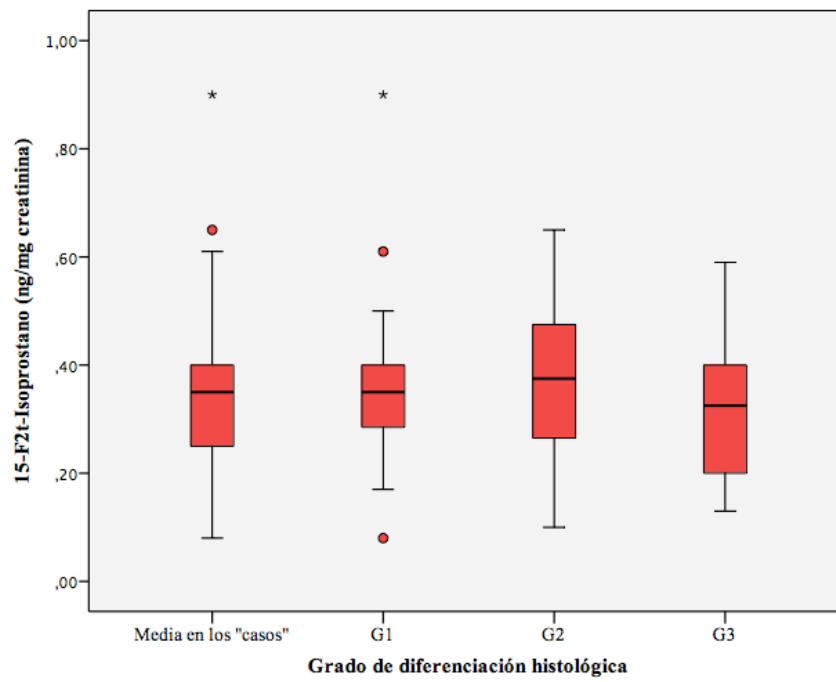
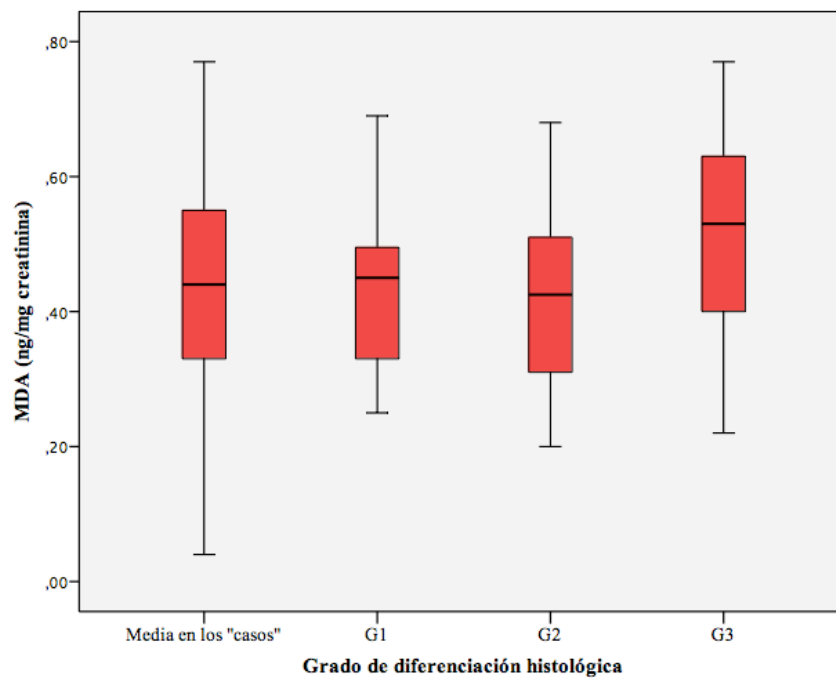
Figura 4.22. Niveles de 15-F2t-Isoprostano según grado histológico**Figura 4.23. Niveles de MDA según grado histológico**

Figura 4.24. Niveles de 8-OH-dG según grado histológico

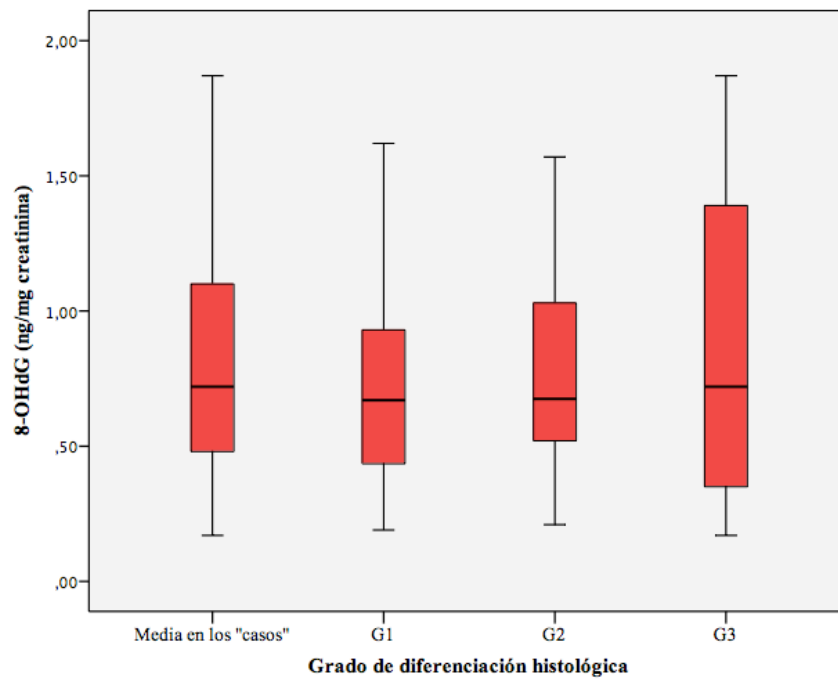
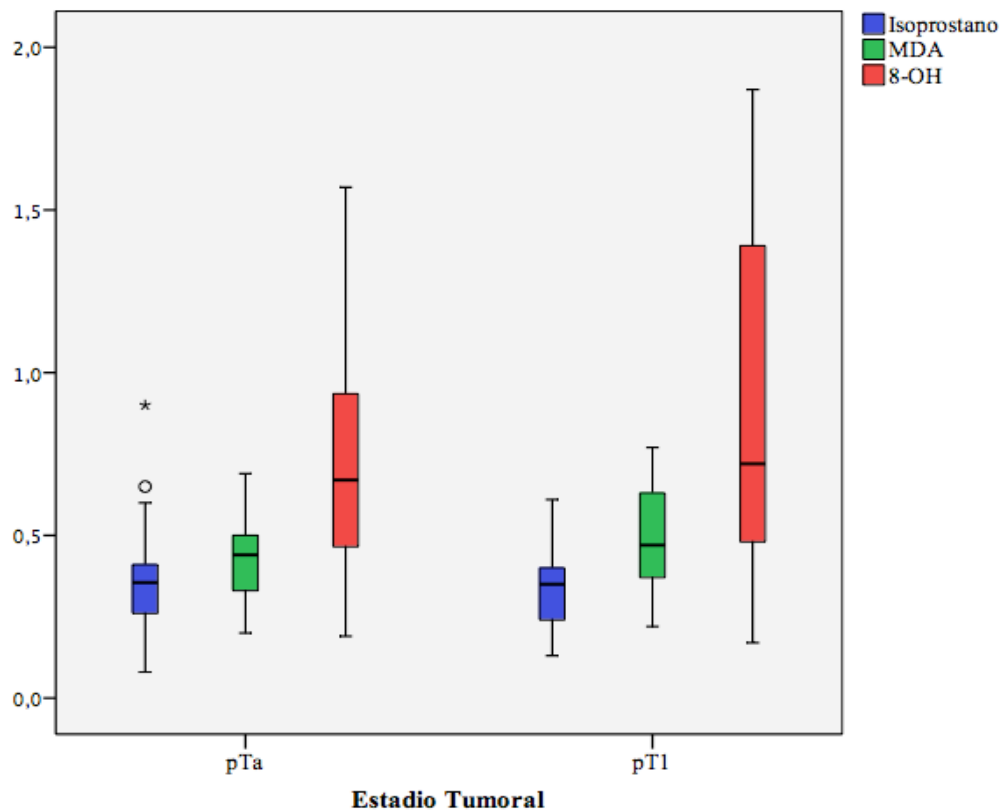


Figura 4.25. Niveles de los biomarcadores según estadio tumoral



4.3. RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA

Se comprobó la precisión diagnóstica de la citología urinaria y del NMP22, herramientas de la práctica clínica habitual, para el diagnóstico y seguimiento del tumor vesical, en nuestra muestra de estudio

Tabla 4.6.- Precisión diagnóstica global de la citología y el NMP22

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Proporción de Verdaderos Positivos (%)	Proporción de Falsos positivos (%)	Proporción de Verdaderos Negativos (%)	Proporción de Falsos Negativos (%)
Citología	37,88	90,24	89,3	10,71	43,25	57,75
NMP22	38,2	100	100	0	51,4	48,6

Realizamos curvas de rendimiento diagnóstico (curvas ROC) para estudiar cuáles serían los puntos de corte óptimo de los distintos marcadores de estrés oxidativo, según los criterios de Youden (el punto de corte óptimo es aquel para el que el Índice de Youden es máximo, siendo el Índice de Youden = $S - (1 - E)$, donde S es sensibilidad y E es especificidad) a partir del cual podríamos considerar el diagnóstico de tumor vesical. De este modo consideramos como punto de rendimiento óptimo el valor de **0,21 ng/mg de creatinina** (Índice de Youden = 0,763) para el 15-F2t-Isoprostano, ya que presenta una sensibilidad diagnóstica del 81,2% con una especificidad del 95,1%. En el caso del malondialdehído, se eligió el valor de **0,435 ng/mg de creatinina** por presentar una mejor relación sensibilidad/especificidad (Índice de Youden = 0,527), siendo su sensibilidad 55,1% y su especificidad 97,6%. (Figuras 4.26 y 4.27)

LA 8-OHdG presenta, en nuestra serie, un comportamiento diferente al de los otros dos marcadores, siendo su valor más bajo en los casos que en los controles. En este caso, el análisis nos permite seleccionar el valor **de 0,515 ng/mg de creatinina** como punto óptimo *por debajo del cual* establecer el diagnóstico de tumor vesical con una sensibilidad del 31,2% y una especificidad del 95,1% (Índice de Youden = 0,27) (Figura 4.28)

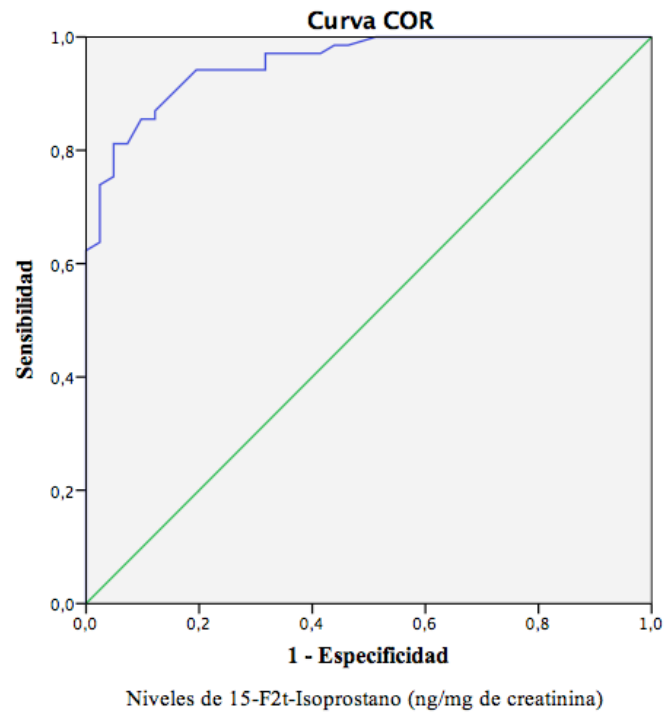
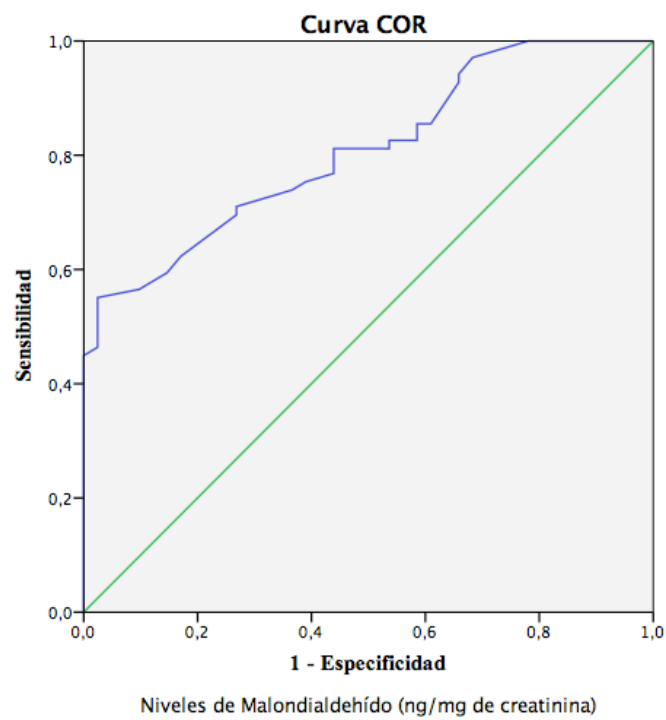
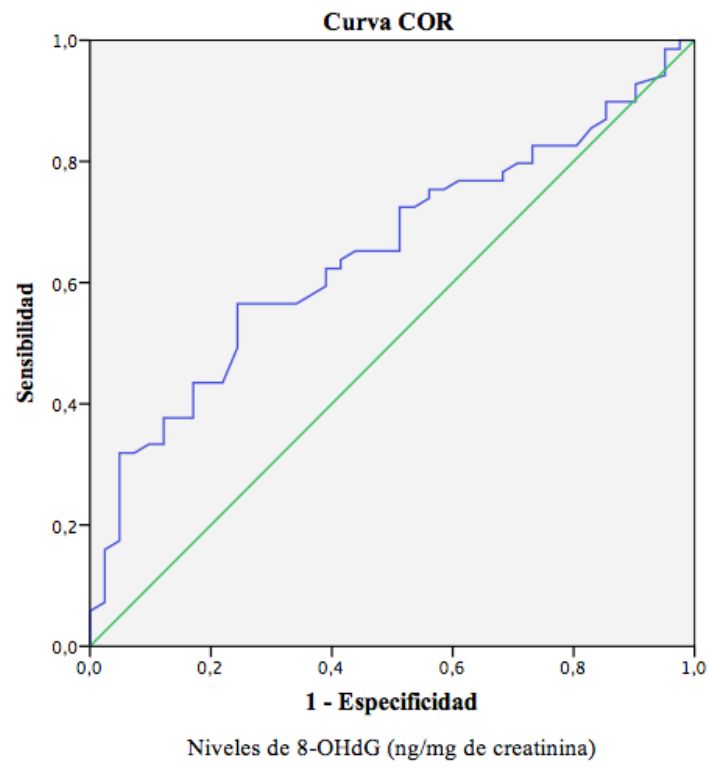
Figura 4.26. Curva de rendimiento diagnóstico del 15-F2t-Isoprostano**Figura 4.27. Curva de rendimiento diagnóstico del Malondialdehído**

Figura 4.28. Curva de rendimiento diagnóstico de la 8-OHdG



V. DISCUSIÓN

5.1. DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO

5.1.1. Diseño del estudio

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es comprobar si los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo son más elevados en pacientes que padecen carcinoma urotelial vesical que en pacientes sin dicha enfermedad, así como el comportamiento de estos marcadores tras la resección quirúrgica del tumor, valorando su posible papel para el diagnóstico y/o seguimiento de dicha enfermedad.

Para ello se diseñó un estudio de casos y controles, seleccionando como casos pacientes con tumor vesical y como controles pacientes sanos. Este tipo de estudios se enmarcan dentro de los estudios observacionales de tipo analítico.

Uno de los objetivos esenciales de la ciencia es la determinación de relaciones de causalidad. Los estudios de casos y controles permiten la detección de factores de riesgo de enfermedades en periodos de tiempo relativamente pequeños, pero pueden inducir fácilmente al error si no se planifican adecuadamente.

No vamos a ahondar aquí en la importancia de la metodología estadística en las investigaciones biomédicas, puesto que no es el objetivo de este trabajo. Sí debemos señalar que una de las mayores tentaciones en las que muchos estudios tienden a caer, parte de la confusión que sus autores tienen entre asociación y causalidad. Encontrar asociaciones entre dos variables es tarea casi siempre elemental, pero, para asegurar que se ha encontrado una relación de causa-efecto, es necesario hacer estudios correctamente diseñados y manejar simultáneamente sistemas de variables interrelacionadas.

La frecuencia con la que aparecen los factores presuntamente relacionados con el resultado, constituye el objeto de comparación entre los dos grupos; en nuestro trabajo no se estudian frecuencias o proporciones, sino los niveles de los marcadores de estrés oxidativo. Debido a que se busca "hacia atrás", a partir de un factor determinado, la posible causa del mismo o los factores relacionados con el mismo a veces, se califican a estos estudios de "retrospectivos", denominación que puede inducir a confusión, ya que actualmente, los términos "retrospectivos" y "prospectivos" se usan cada vez más para indicar simplemente el periodo de recogida de los datos respecto a la

fecha actual.

Este tipo de estudios, ha experimentado un auge en popularidad e importancia, constituyendo actualmente una herramienta crucial en la investigación epidemiológica.

La mayor ventaja de los estudios de casos y controles radica en el grado de información que ofrecen, ya que se pueden estudiar un gran número de casos de la enfermedad, mientras que en un estudio de cohorte sólo unos pocos desarrollarán la enfermedad. Esta ventaja se ve acrecentada cuando se estudian enfermedades poco frecuentes. Además permite evaluar varios factores de riesgo simultáneamente y la existencia de interacciones entre ellos. Una segunda ventaja es su eficiencia, ya que se realizan en mucho menos tiempo y con un coste menor que los estudios de cohortes, al no tener que realizar seguimientos a los pacientes a lo largo del periodo de latencia de la enfermedad.

Su limitación más importante es que son muy susceptibles a la introducción de sesgos, tanto en la selección de los grupos como en la información que se obtiene sobre los factores de riesgo.

Los estudios de casos y controles no proporcionan una estimación directa de la incidencia ni de la prevalencia de la enfermedad, ya que la proporción de participantes expuestos en el estudio viene determinada por el investigador, no por la proporción de expuestos que existe en la población. En este tipo de estudio puede fácilmente darse el efecto de la confusión.

Para los objetivos del presente trabajo se estimó que éste era el diseño óptimo, por permitir seleccionar desde el inicio la presencia o no de tumor vesical, conociendo además sus características patológicas (estadio tumoral, grado histológico, número y tamaño de tumores) así como por permitir tener controlada la presencia de factores de riesgo de estrés oxidativo (diabetes, cardiopatía, dislipemia...). Además, la información clínica necesaria para nuestro estudio es poco susceptible de sufrir sesgo de memoria, ya que se extrae directamente de sus antecedentes patológicos recogidos en la historia clínica de cada uno de los pacientes.

El análisis de los diferentes factores relacionados con estrés oxidativo (variables clínicas y patológicas) y su relación con los marcadores del estudio se realizó de manera transversal. La característica principal de un estudio transversal es que no existe continuidad en el tiempo, sino que lo que pretende es conocer todos los casos con una

cierta condición en un momento concreto del tiempo, de manera que se mide la variable predictora o factor de riesgo y la variable resultado o enfermedad simultáneamente. Este tipo de estudios no permite sacar conclusiones del tipo causa-efecto, pero sí que permite la generación de nuevas hipótesis que deberán ser verificadas por estudios analíticos.

Entre las ventajas de los estudios transversales se encuentran que permiten estudiar varias variables resultado a la vez y tienen corta duración en el tiempo porque no precisan seguimiento, con el consiguiente poco costo económico. Son útiles para el estudio de enfermedades crónicas en la población.

Como contrapartida, tienen la particularidad de que no es posible establecer la direccionalidad de las asociaciones, no sabemos si el efecto observado es causa o consecuencia, de la misma manera que tampoco podemos distinguir entre factores de riesgo y factores pronóstico porque de antemano ya los investigadores sabemos cuántos individuos padecen la enfermedad. La información de la exposición es muy vulnerable a errores de medición o ambigüedad temporal si se recogen exposiciones actuales.

5.1.2. Población del estudio

En cuanto a la muestra del estudio, se incluyeron 110 pacientes, 69 de los cuales presentaban tumor vesical y se incluyeron el grupo de “casos” y 41 eran pacientes sanos (“controles”). Esta discrepancia en los tamaños muestrales se debe al número de pacientes que no entregaron adecuadamente la muestra postoperatoria. De los 69 casos, 38 pacientes no entregaron la segunda muestra, cuya fecha de recogida estaba programada para un mes tras la intervención. Esta recogida de orina estaba programada para este momento ya que coincide con la visita de control postoperatoria, donde se informa al paciente de los resultados patológicos de su intervención y se inician los tratamientos adyuvantes pertinentes, por lo que en la mayoría de los casos, al no aportar a tiempo la muestra, no fue posible tomarla en otro momento por haberse iniciado instilaciones de mitomicina C o BCG (según indicase su estadio y grado patológicos). Debido a esto, fue preciso aumentar el número de pacientes en el grupo de casos.

Pese a estas diferencias, se analizaron el total de pacientes incluidos, realizándose las comparaciones entre casos y controles con el total de la muestra y las

comparaciones entre casos (comparación de medias para casos apareados) sólo con los 31 pacientes que tenían su muestra pre y postquirúrgica.

Desde el punto de vista metodológico, pese a existir diferencias en los tamaños de los grupos, éstas no son importantes, siendo los grupos comparables en tamaño.

5.2. METODOLOGÍA DE MEDICIÓN

Para la medición de los niveles de los marcadores de estrés oxidativo empleados en esta Tesis (8-OHdG, 15-F2t-Isoprostano y MDA), se realizaron test de ELISA sobre una muestra de orina recogida de la primera micción de la mañana, para determinar los niveles de 8-OHdG y de 15-F2t-Isoprostano, y medición espectrofotométrica de aductos MDA-TBA₂ para la determinación de los niveles de MDA, tal como ha quedado descrito en el apartado “Material y Método”.

Los niveles urinarios de cualquier producto de estrés oxidativo dependen de una adecuada excreción renal. Por este motivo, la insuficiencia renal puede afectar a los niveles de excreción urinaria de los marcadores de estrés oxidativo (121). Si bien en nuestro estudio ningún paciente padecía insuficiencia renal clínicamente significativa, los niveles de los marcadores fueron normalizados de acuerdo a los niveles de creatinina de los pacientes. Otra forma de normalizar los resultados es de acuerdo al peso y volumen de orina emitido en 24h. Sin embargo en nuestro trabajo se emplea la determinación única en orina emitida espontáneamente en la primera micción del día. De este modo, algunos estudios expresan los niveles de los marcadores en relación con la creatinina del sujeto, dando los resultados en *ng/mg de creatinina*, como se ha hecho en este trabajo o bien en *kg/g creatinina*. Los grupos que realizan las mediciones en orina de 24h las suelen expresar en picomoles/kg/24h. Esto supone un problema a la hora de realizar comparaciones entre los distintos trabajos publicados, puesto que no existe estandarización ni en la metodología de recogida de muestra, ni en la técnica de medición ni en la forma de expresar dichas mediciones. Discutiremos individualmente esta metodología de recogida de muestra y de análisis para cada uno de nuestros marcadores, puesto que presentan características propias que merecen ser comentadas de manera individual.

5.2.1. Medición de niveles de 8-OHd-G

La técnica más habitual para la medida de los niveles de 8-OHdG es la cromatografía líquida de alto rendimiento (*high performance liquid chromatography* – HPLC). Éste se considera el método de elección para la cuantificación de la 8-OHdG en tejidos, linfocitos y en plasma. Para analizar la 8-OHdG en estas localizaciones, la 8-OHdG debe ser liberada desde el ADN nuclear hacia compuestos solubles, mediante procesos enzimáticos, antes de poder ser cuantificada. Este procedimiento tiene la ventaja de poder medir diversos productos oxidados al mismo tiempo. La cromatografía también ha sido empleada para mediciones en plasma y orina, sin embargo esto requiere complejos pasos de extracción de fase sólida, pre purificación de la orina, separación empleando columnas de carbono... para medir adecuadamente la 8-OHdG.

Más recientemente se ha desarrollado la espectrometría de masas tándem (*Tandem Mass Spectrometry*, también llamada MS/MS o MS²) para la medición urinaria de especies 8-hidroxiladas de guanosina, sin necesitar de procesos de extracción ya que precisa la inyección directa de orina en un espectrómetro de masas en tándem.

A pesar del desarrollo de los espectrómetros de masa y de sus aparentes mejores resultados en la medición de 8-OHdG, el procedimiento sigue siendo complejo y costoso, difícil de implementar en laboratorios clínicos. Los test ELISA son más sencillos de llevar a cabo, y presentan una buena correlación con los de HPLC. Así, un estudio llevado a cabo por Tsuboi y colaboradores (122) mostraba una correlación de $r=0,833$, entre los procedimientos de ELISA y HPLC para la medición urinaria de 8-OHdG. Sin embargo, Shimoi et al (123) encontraron que las mediciones con ELISA presentaban niveles hasta el doble de elevados que con HPLC. Por razones que no pudieron explicar, hasta un 10% de las mediciones presentaban hasta 4 veces el valor calculado con HPLC. Además, se ha comprobado que los niveles de 8-OHdG medidos por ELISA presentan fluctuaciones según el momento en que se midan, si bien se ha comprobado que los niveles urinarios en la primera micción de la mañana presentan buena correlación con los niveles medidos en orina de 24 horas ($r=0,75$) (124). Por todo esto y pese a las limitaciones que hemos señalado, la tendencia actual apunta a las mediciones mediante ELISA, principalmente por su mayor facilidad de implantación en el ámbito clínico, máxime cuando se ha probado la utilidad de la determinación urinaria

en la primera micción de la mañana, que facilita aún más la toma de muestras para su uso clínico. Así, trabajos como el realizado por el grupo del Dr. Chío (113), emplearon muestras de orina emitida espontáneamente para la medición mediante ELISA de los niveles de 8-OHdG en pacientes sanos y pacientes con cáncer de próstata, con resultados que comentaremos posteriormente.

Por lo tanto, si bien las técnicas de ELISA son cuestionadas por no presentar una precisión muy elevada, su mayor facilidad de implantación y realización en el ámbito clínico hace que su presencia en los estudios publicados sea cada vez mayor, considerándose una técnica apropiada para la medición de la 8-OHdG.

5.2.2. Medición del Malondialdehído (MDA)

El malondialdehído ha sido medido desde los años '60, y los mismos principios en los que se basaba su determinación siguen vigentes en la actualidad. Sin embargo, existen bastantes inconsistencias en las mediciones de este biomarcador, lo que ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas para su determinación.

La técnica más simple y más frecuentemente empleada es el uso del ácido tiobarbitúrico (TBA). Habitualmente el proceso implica el calentamiento y acidificación de las muestras y su exposición al TBA, lo que conlleva la formación de productos coloreados (coloración rosada) que pueden ser medidos mediante colorimetría o fluorescencia. Este método, pese a su uso amplio y aceptado, presenta el inconveniente de su inespecificidad, dado que el ácido tiobarbitúrico no sólo se une al MDA y a sustancias derivadas del mismo, sino que es capaz de unirse a otras sustancias que también participarán en la coloración final que será medida (estas sustancias son llamadas *tiobarbitúrico acid reactive substances* – TBARS), dando falsos niveles de malondialdehído (125). Además esta técnica puede realizarse de diferentes maneras, no existiendo una estandarización del procedimiento, lo que conlleva dificultad a la hora de comparar los resultados de los diferentes estudios. Debido a estos problemas, la medición de MDA basada en TBA ha sido criticada, pese a lo cual sigue siendo el método más empleado para su medición.

Para mejorar la especificidad de esta técnica, se han desarrollado métodos de medición basados en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se sabe que, en un pH ácido, el MDA presenta una absorción ultravioleta máxima a 245 nm, siendo ésta

de 267 nm en soluciones neutras o alcalinas (126). La HPLC aprovecha esta característica realizando mediciones directas. Sin embargo, comparado con los aductos de MDA(TBA)₂, que presentan absorción a 532 nm, y una alta fluorescencia, la absorción de MDA es tan sólo moderada, por lo que existe una importante contaminación “de fondo”. Por estos motivos, las técnicas basadas en UV presentan mejor especificidad pero menor sensibilidad (127).

Al igual que sucede con los otros biomarcadores, existe un reciente interés por el uso de test de ELISA para las determinaciones de MDA. Teóricamente, los test de ELISA cumplirían todos los criterios necesarios para una técnica “ideal” para la determinación de MDA. Se trata de un test sensible, que permite detectar el MDA incluso en pacientes sanos; permite usar simultáneamente dos anticuerpos, lo que incrementa la especificidad y elimina las interferencias de otras biomoléculas similares. Su uso ha sido validado demostrando solidez y reproducibilidad (128), si bien su empleo en la práctica clínica es, de momento, muy limitado. No hemos encontrado en la literatura estudios que midan los niveles urinarios de MDA mediante ELISA.

El uso clínico del MDA como marcador se ha desarrollado principalmente para el estudio de dislipemias, cardiopatía, diabetes... si bien existe cada vez más evidencia de su relación con patología oncológica (129)(130)(131) siendo el medio habitual para su detección el plasma. Del mismo modo, existe evidencia que demuestra que los niveles plasmáticos de MDA pueden verse influidos por la ingesta lipídica, no habiéndose estudiado este fenómeno en orina.

Por todo ello, y pese a sus limitaciones, el uso del ácido tiobarbitúrico para la determinación del MDA sigue siendo la prueba de elección, por su sencillez, por la experiencia acumulada y por aceptación general.

5.2.3. Medición de los niveles de 15-F2t-Isoprostano

En cuanto a los isoprostanos, los F2-Isoprostanos pueden ser encontrados en cantidades medibles tanto en muestras de sangre como de orina, tanto en la población general como bajo determinadas condiciones patológicas (132). Los F2-Isoprostanos, así como sus metabolitos, son compuestos químicamente estables en orina, y sus niveles de excreción urinaria no son modificados por la dieta. Los estudios que existen al

respecto muestran que los niveles urinarios de isoprostanos son estables intra-individuo (especialmente cuando son valorados en la primera micción de la mañana) (133). Los niveles urinarios de F2-Isoprostanos han sido validados como marcadores sensibles de estrés oxidativo, tanto en modelos animales (134) como modelos clínicos (135), considerándose muy buenas herramientas para establecer el grado de estrés oxidativo.

Sin embargo, la cuantificación de F2-Isoprostanos conlleva un reto, puesto que, como se explicó anteriormente en la Introducción de la presente Tesis, existen hasta 64 esteroisómeros estructuralmente muy similares. Las tres técnicas más empleadas para la detección de isoprostanos son la espectrometría de masas en tándem, cromatografía líquida de alto rendimiento y las técnicas de ELISA. Las técnicas basadas en ELISA se consideran menos específicas, puesto que presentan reactividad cruzada en mayor o menor medida con diferentes isómeros, por lo que en algunos estudios evitan incluso hablar de la detección de un isoprostano concreto y se refieren a mediciones de grupo (por ejemplo, F2-Isoprostanos en lugar de referirse al 15-F2t-Isoprostano). De esta manera, la Dra. Brys y colaboradores (136), publicaron un trabajo en el que estudiaron los niveles urinarios de 8-isoprostano (recordemos que es otra de las nomenclaturas que adopta el 15-F2t-Isoprostano). Para ello emplearon determinaciones mediante ELISA en orina de la primera micción de la mañana. Sin embargo, Barocas y colaboradores (137) realizan otro trabajo, con el mismo objetivo, empleando técnicas de cromatografía de gases con espectrometría de masas para medir el 15-F2t-Isoprostano. En ambos trabajos se encontraron niveles urinarios más elevados de 15-F2t-Isoprostano en las muestras procedentes de pacientes con cáncer de próstata.

Algunas publicaciones sugieren que la correlación entre la medición de Isoprostanos concretos y la de grupo es normalmente baja, aproximadamente 0,3. (138), otros trabajos al respecto, muestran índices de correlación mayor (0,5 e incluso superiores). Del mismo modo, queda por definir si es relevante, desde el punto de vista del estudio del estrés oxidativo, la detección de esteroisómeros concretos o es igualmente útil la detección de grupo. En este sentido, como ya señalamos previamente, Il'yasova y colaboradores (97), estudiaron la relación de 4 isómeros de F2-Isoprostanos con la diabetes tipo II, concluyendo que era muy similar, mientras que la relación de estos mismos isómeros con la obesidad era diferente. Así, cada isómero puede estar relacionado específicamente con diferentes situaciones, ya que diferentes fuentes de radicales libres podrían favorecer la génesis de diferentes isómeros y, de este modo, se justificaría su caracterización individual. Sin embargo, el 15-F2t-isoprostano, el

marcador empleado en nuestro estudio, aparece también relacionado con cáncer de próstata, de pulmón (139), o en patologías no oncológicas como la propia diabetes o la depresión (140), por lo que queda aún mucho por esclarecer sobre el papel que desempeña cada isómero de isoprostano en las diferentes patologías o condiciones clínicas. En cualquier caso, parece evidente que el uso de ELISA para la detección de isoprostanos representa un medio fiable y de mayor aplicabilidad a la práctica clínica.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Variables clínicas

Las diferentes variables clínicas que se tuvieron en cuenta en el presente estudio, fueron recogidas de las historias clínicas de los pacientes en el momento de la toma de la muestra. La distribución de estas variables fue homogénea en los dos grupos, con la excepción de la edad, la distribución en cuanto a sexo (mayor proporción de mujeres en el grupo de controles) y de la proporción de pacientes diabéticos, que fue superior en el grupo de casos.

5.3.1.1. Edad

El objetivo para el presente trabajo era trabajar con edades calculadas a modo de variable cuantitativa continua, restando a la fecha de recogida de la muestra la fecha de nacimiento del paciente, sin embargo por la existencia de errores en el registro de las fechas (mal registro de la fecha de toma de datos o toma de la muestra), existía un elevado número de datos perdidos (8 casos), por lo que se trabajó con la “Edad en años cumplidos”, aplicando un factor de corrección de +0,5 años, como es práctica habitual en este caso.

La edad es un factor importante implicado en el estrés oxidativo, tanto de manera directa, como también de manera indirecta, puesto que, tanto el tumor vesical, como muchas patologías asociadas a estrés oxidativo incrementan su prevalencia con la edad (diabetes tipo 2, cardiopatía isquémica, dislipemias...).

El proceso de envejecimiento puede ser definido como el declinar progresivo en las funciones fisiológicas de un organismo después de la etapa reproductiva de su vida. La teoría del envejecimiento debido a radicales libres fue introducida en 1956 por Denham Harman (141). Su trabajo propició un aumento del interés por el estudio de la acción de los radicales libres en los sistemas biológicos. Básicamente existen dos grandes teorías que describen el proceso de envejecimiento: las teorías del acúmulo de daños y las teorías genéticas. Dentro de las teorías de “acúmulo de daños”, se encuentran las teorías del envejecimiento por radicales libres, teoría de la glicación, teoría del error catastrófico, teoría de membrana... de todas estas, la teoría de los radicales libres es probablemente la que introduce la aproximación más compleja al fenómeno del envejecimiento.

La teoría de los radicales libres se basa en el hecho de que los efectos deletéreos aleatorios producidos por radicales libres durante el metabolismo aeróbico causa daños en el ADN, lípidos y proteínas, que se acumula a lo largo de la vida (142). La génesis del envejecimiento comienza con el oxígeno, ocupando la posición final de la cadena de transporte de electrones. Incluso en condiciones ideales, algunos electrones se fugan de la cadena de transporte. Estos electrones fugados interactúan con el oxígeno produciendo radical superóxido, de tal manera que, en condiciones fisiológicas, aproximadamente el 1-3% de las moléculas de oxígeno en la mitocondria están en forma de superóxido. La primera diana para el radical superóxido es el ADN mitocondrial (ADNm) (61). Las células son capaces de reparar la gran mayoría del daño que sufre el ADN nuclear, pero el ADNm no puede ser reparado, por lo que, de este modo, se va acumulando daño sobre el material genético mitocondrial a lo largo de la vida, haciendo fracasar a las mitocondrias y morir, subsiguientemente, a las células, causando envejecimiento. En humanos, los niveles de daño oxidativo en el ADN, medido por marcadores urinarios, puede ser modulado por restricción calórica y alteraciones en la composición de la dieta, por lo que la longevidad podría depender no sólo de la tasa metabólica sino también de la ingesta calórica diaria.

La acumulación de daño derivado de radicales libres puede ilustrarse por el incremento de los niveles séricos de 8-OHdG, relacionado con la edad en individuos sanos en el rango de 15 a 91 años (143). Así mismo se ha comprobado con estudios *in vitro* e *in vivo* que la capacidad de reparar el daño sobre e ADN nuclear disminuye con la edad. Estudios en animales, sin embargo, parecen indicar que el acúmulo creciente de

8-OHdG en tejido se debe a la mayor susceptibilidad al daño oxidativo, no a alteraciones en su capacidad de reparación (144,145).

En nuestro estudio encontramos una diferencia significativa ($p=0,01$) en la media de edad del grupo de control frente al grupo de casos, siendo mayor en éste último (73,2 años frente a 67,43 años para el grupo de controles). Teniendo en cuenta la metodología seguida para la selección de controles, este resultado es explicable por la epidemiología del tumor vesical, que es más frecuente en personas de edades más avanzadas (aproximadamente el 80% en personas >60 años). El análisis estadístico se hizo homogeneizado por la edad, de tal manera que las diferencias encontradas en los niveles de los marcadores de estrés oxidativo entre los grupos no son explicadas por esta diferencia de edad.

5.3.1.2. Distribución por sexos

Encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución por sexos, entre los grupos de casos y controles, siendo de 24% en el grupo de controles y de 9% en el grupo de casos ($p=0,047$). No encontramos diferencias en los valores de los marcadores en función del sexo, si bien se decidió incluir en el análisis de factores de riesgo.

El papel del sexo en los niveles de los marcadores de estrés oxidativo ha sido estudiado en diversos trabajos. Taylor et al (146) estudiaron el papel tanto del tabaquismo como del sexo en los niveles urinarios de diversos isoprostanos: 15-F2t-Isoprostano (al que se refieren como 8-iso-PGF 2α), 8-iso-15(R)-PGF 2α , PGF 2α , 2,3-dinor-F1 y 2,3-dinor F2. Ahondaremos más adelante en los hallazgos en relación al hábito tabáquico. En cuanto al sexo, encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles urinarios de todos los isoprostanos medidos, presentando las mujeres niveles más elevados. Sin embargo, Raymond y colaboradores (147), en un estudio en el que valoran la influencia del síndrome metabólico en los niveles de los marcadores de estrés oxidativo, no encontraron diferencias en los niveles plasmáticos ni urinarios de 15-F2t-Isoprostano entre hombres y mujeres. También valoraron los niveles urinarios de 8-OHdG, sin encontrar diferencias basadas en el género. Otro estudio, llevado a cabo por Bloomer y colaboradores (148), estudia el papel del ejercicio físico en los niveles plasmáticos de MDA y 8-OHdG. Encontraron niveles plasmáticos de

MDA significativamente inferiores en el grupo de mujeres, independientemente del nivel de ejercicio. No hallaron diferencias en las concentraciones de 8-OHdG.

En nuestro estudio la proporción de mujeres es baja, debido a la distribución de del cáncer vesical, que es entre 3 y 10 veces más frecuente en varones, si bien no hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos de estudio según el sexo.

5.3.1.3. Papel de la diabetes

La proporción de pacientes diabéticos en el grupo control fue del 4,9% y en el grupo de casos del 18,8%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,04$). Sin embargo, el análisis de la varianza demuestra que las diferencias observadas en los niveles de los distintos marcadores de estrés oxidativo no están influenciadas por la presencia o no de diabetes mellitus. En la bibliografía existen datos contradictorios a cerca de los niveles de marcadores de estrés oxidativo y su relación con la diabetes. Los marcadores que más se han relacionado con esta enfermedad los isoprostanos, principalmente los pertenecientes a la familia F2, habiéndose estudiado tanto sus niveles plasmáticos como urinarios. Así, un estudio realizado por S. Basu (149) demostraba niveles elevados de isoprostano tanto en plasma como en la orina de los pacientes diabéticos, sin embargo, estudios posteriores como el I. Spasojevic y colaboradores (98) muestran una relación inversa entre la presencia de diabetes y los niveles urinarios de isoprostanos. En este sentido, Il'sova y colaboradores (150) realizaron un trabajo valorando el papel de cuatro isómeros de isoprostanos del grupo F2 en orina (isoprostano PF2 α -III; 2,3-dinor-isoprostano PF2 α -III; isoprostano PF2 α -VI; y el isoprostano 8,12-iso-PF2 α -VI) de pacientes con diabetes mellitus y diferentes factores de riesgo (obesidad, resistencia a insulina) y pacientes sanos, encontrando una asociación inversa entre los niveles urinarios de estos isoprostanos y el perfil de riesgo diabético, presentando los pacientes de peor pronóstico niveles más bajos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa para todos los isoprostanos excepto el isoprostano PF2 α -III.

Otros trabajos han estudiado los niveles de MDA y 8-OHdG en los pacientes diabéticos (151), encontrando niveles plasmáticos superiores en diabéticos que en pacientes sanos, no encontrando estudios que midan los niveles urinarios de estos marcadores en pacientes diabéticos.

En nuestra muestra no se hallaron diferencias significativas entre el grupo de diabéticos y no diabéticos en los niveles de ninguno de los marcadores estudiados. Teniendo en cuenta la controversia que existe en este tema en los trabajos publicados hasta la fecha, es complicado extraer conclusiones firmes. Debe tenerse en cuenta, además, que el total de los pacientes diabéticos de nuestro estudio recibía tratamiento para su enfermedad (10 pacientes en tratamiento con Metformina, 4 pacientes en tratamiento con pautas de insulina y 1 paciente en tratamiento combinado con Metformina e Insulina), por lo que habría que tener en consideración el rol que los diferentes antidiabéticos puedan jugar en los niveles de los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo. Igualmente, carecemos de estudios que determinen cuales son los niveles urinarios “normales” en el paciente sano y en los pacientes diabéticos, por lo que no es posible extraer conclusiones más allá de no haber encontrado diferencias significativas entre los diabéticos y no diabéticos en nuestro estudio.

5.3.1.4. Influencia del tabaquismo, dislipemia y cardiopatía isquémica

Al igual que sucede con la diabetes mellitus, existen numerosos artículos que relacionan la presencia de estas condiciones patológicas con niveles plasmáticos más elevados de los marcadores de estrés. Si bien la distribución de estas patologías fue homogénea entre el grupo de casos y controles, estudiamos igualmente su posible relación con los niveles urinarios de los diferentes marcadores, no encontrando diferencias entre los que tenían y no tenían cardiopatía isquémica, dislipemia e hipertensión.

De estas variables estudiadas merece la pena realizar un par de comentarios sobre el tabaquismo. El hábito tabáquico es el principal factor de riesgo para el desarrollo de tumor vesical. El tabaquismo ha sido relacionado con situaciones de estrés oxidativo en múltiples trabajos.

Como señalamos anteriormente, el grupo de Taylor y colaboradores (146) desarrollaron un estudio para comprar los niveles urinarios de diferentes isoprostanos valorando el hábito tabáquico y el sexo. Para ello realizaron mediciones mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas. Analizaron el papel del 15-F2t-Isoprostano, 2-3-dinor-5,6-dihidro-8-iso-PGF_{2α} y del 2-3-dinor-8-isoprostano,

encontrando diferencias únicamente en los niveles del 15-F2t-Isoprostano, que presentaba niveles urinarios superiores en el grupo de fumadores.

En cuanto al MDA, Lykkesfeldt (125) realizó una revisión sistemática de la bibliografía, analizando los niveles de MDA en fumadores y no fumadores. En esta revisión se incluyeron 45 estudios que valoran los niveles de malondialdehído en diferentes muestras (saliva, plasma, líquido seminal, orina, esputo), empleándose MDA/TBA como método más frecuente para las mediciones. Un 80% de los trabajos encontró diferencias significativas entre los dos grupos, con niveles superiores de MDA para el grupo de fumadores. El otro 20% no encontró diferencias estadísticamente significativas, hallándose en un solo trabajo, niveles superiores de MDA en no fumadores.

La relación del tabaquismo con la 8-OHdG también ha sido estudiada. Set et al (152) realizaron un estudio valorando los niveles de F2-Isoprostanos, F4-neuroprostanos, 7-ketocolesterol, 24 y 27 hidroxicolesterol y de 8-OH-desoxiguanina, en plasma y orina. Valoraron también los niveles justo después de pedir a los pacientes fumadores que se fumaran un cigarro, valorando el efecto de exposición tanto crónica como aguda. Encontraron diferencias en los niveles plasmáticos y urinarios de F2-Isoprostanos y de las formas oxidadas de colesterol, no así diferencias en los niveles de 8-OHdG.

En el presente trabajo no hemos encontrado diferencias en los niveles urinarios de los marcadores estudiados entre fumadores y no fumadores. Tampoco se han encontrado diferencias atendiendo al número de cigarrillos/día consumidos. El objetivo de esta Tesis no era encontrar estas diferencias sino eliminar el tabaco como factor de confusión para valorar el papel del tumor vesical. En este sentido, el hábito tabáquico, como factor patológico, quedó distribuido de manera homogénea entre los dos grupos de estudio, no influyendo en los niveles medidos de los marcadores de estrés oxidativo.

5.3.2. Marcadores de estrés oxidativo

El objetivo principal de la presente Tesis era valorar los niveles de 15-F2t-Isoprostano, Malondialdehído y 8-hidroxi-d-Guanosina en pacientes que presentaban tumor vesical y pacientes sin esta condición patológica, bajo la hipótesis de que presentar este tumor está relacionado con situaciones de estrés oxidativo, ya como causa

o como consecuencia de la presencia de dicho tumor. De este modo, hemos podido comprobar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de todos los marcadores estudiados entre el grupo de casos y el de controles. Formaba parte de los objetivos de este trabajo determinar si los pacientes recuperaban niveles normales de estos marcadores tras someterse a cirugía resectora tumoral (Resección transuretral de tumor vesical), encontrándonos que los niveles de los marcadores se igualan a los del grupo control al mes de la intervención quirúrgica.

El 15-F2t-Isoprostano es el isoprostano que más presencia tiene en la investigación clínica. Se ha encontrado elevación de los niveles de isoprostano tanto plasmáticos, como tisulares como urinarios en relación con diferentes patologías, como ya se ha señalado antes en este texto. Existen pocos estudios que estudien los niveles urinarios de Isoprostanos en relación con patología oncológica urológica. El trabajo realizado por Barocas y colaboradores (137), en el que midieron mediante ELISA los niveles urinarios de pacientes sometidos a biopsia transrectal prostática, encontró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de 15-F2t-isoprostano entre los pacientes que presentaban PIN de alto grado y cáncer de próstata en dicha biopsia en relación con pacientes sin hallazgos patológicos. Comprobaron, además, que los niveles eran más elevados según aumentaba la diferenciación histológica medida por el grado de Gleason en la biopsia. En este sentido, Brys y colaboradores (136) realizaron un trabajo similar, empleando para la medición HPLC en lugar de ELISA. Sus hallazgos fueron superponibles al del grupo de Barocas, encontrando también asociación entre el grado de diferenciación y los niveles de Isoprostanos. Desafortunadamente, ninguno de los trabajos exploró el comportamiento de los niveles tras el tratamiento del cáncer de próstata, por lo que no podemos conocer si, al igual que sucede en nuestro trabajo, los niveles se normalizan tras eliminar el tumor. No hemos encontrado en la bibliografía otros trabajos que valoren el papel de los isoprostanos en el cáncer vesical.

En cuanto a los niveles de Malondialdehído, el comportamiento encontrado en nuestro estudio es similar al del 15-F2t-Isoprostano, es decir, el grupo de casos presenta niveles más elevados de este marcador, siendo esta diferencia estadísticamente significativa; e igualmente importante, tras la cirugía los niveles se igualan con el grupo control. Se ha estudiado el papel del MDA principalmente en relación con dislipemias y cardiopatía, sin embargo existe un creciente interés en comprender el papel que este marcador puede desempeñar en la patología oncológica. El grupo de Nitika y

colaboradores (153) estudió los niveles plasmáticos en pacientes con carcinoma urotelial vesical comparándolo con sujetos sanos, encontrando que los niveles eran superiores en los pacientes que presentaban tumor vesical. Muy interesante en este sentido es el estudio desarrollado por Kaczmarek y colaboradores (154), en el que estudian el papel de las instilaciones de BCG en los niveles de estrés oxidativo. Para ello incluyeron pacientes sanos y pacientes diagnosticados de tumor vesical en los que se llevó a cabo una RTU y cuyo estadiaje precisaba tratamiento adyuvante con instilaciones de BCG. Realizaron mediciones en suero de MDA medido mediante TBA, encontrando niveles superiores en los pacientes afectados por tumor vesical que en los pacientes sanos. Encontraron, también, que los pacientes con tumores de alto grado presentaban niveles superiores si sólo eran tratados mediante cirugía frente a aquellos que recibían instilaciones de BCG. Del mismo modo, el grupo del Dr. Gecit (155) valoró la actividad prolidasa (peptidasa de la familia de las metaloproteasas), los niveles de óxido nítrico (implicado en múltiples procesos fisiológicos, pero también relacionado con la angiogénesis tumoral y su capacidad invasiva y metastásica) y el MDA (como marcador de estrés oxidativo) en el suero de pacientes con tumor vesical, valorando de esta manera el estado oxidativo de estos pacientes. Encontraron, no sólo niveles elevados de malondialdehído en el suero de estos pacientes, sino que este aumento del MDA se acompañaba de aumento de las cifras de óxido nítrico y un descenso de la actividad antioxidante. Sin embargo, no encontramos ningún trabajo que valore el papel de este marcador en muestras urinarias de pacientes con tumor vesical. Este medio sí ha sido empleado, con resultados muy interesantes, para el estudio del cáncer de próstata. Así, un trabajo realizado por Yossepowitch y colaboradores (156) demuestra la relación del cáncer de próstata de alto riesgo con niveles elevados de MDA. Este trabajo ofrece un resultado muy interesante con potencial aplicación clínica. Es conocida la dificultad que encuentra el urólogo para determinar el comportamiento del cáncer de próstata, motivo por el cual se han buscado diferentes parámetros que permitan clasificar a estos tumores en grupos de riesgo en base a los cuales tomar decisiones terapéuticas. El hecho de que el MDA se relacione con los tumores de alto riesgo y no así con los de riesgo intermedio y bajo puede constituir en el futuro una interesante herramienta clínica.

Uno de los problemas con los que nos encontramos a la hora de definir el posible uso clínico de estos marcadores es la falta de especificidad por enfermedad. Es decir, encontramos elevación de marcadores de estrés oxidativo en relación con muchas patologías diferentes, sin que, de momento, seamos capaces de definir marcadores

específicos para cada una de estas condiciones. Sin embargo, los resultados de este trabajo abren una puerta muy importante para el uso de estos marcadores en el cáncer vesical. El hecho de que encontremos una variación de los niveles antes y después de la intervención nos permite generar la hipótesis de la utilidad de estos marcadores para el seguimiento del tumor vesical. Como comprobamos en nuestro trabajo, la sensibilidad y especificidad de estos marcadores es muy alta, superando a la citología y el NMP22 (marcadores de uso clínico habitual).

La citología urinaria en nuestra serie presentó una sensibilidad del 37,88% y una especificidad del 90,24%, datos en consonancia con la bibliografía disponible (157)(158). Así mismo, el NMP22 presenta una $S= 38\%$ y $E= 100\%$, congruente con los trabajos publicados (159)(160). Si calculamos el valor del estadístico J basándonos en estos resultados, la citología tendría un índice de Youden de 0,28 y el NMP22 de 0,38 en nuestra muestra, lo que se consideran resultados malos. Pese a esto, ambos marcadores son de uso extendido en la práctica clínica ya que, si bien su sensibilidad es muy baja, presentan una alta especificidad. Comparado con estos resultados, encontramos que el 15-F2t-Isoprostano tiene una sensibilidad diagnóstica del 81,2% con una especificidad del 95,1% para el punto de corte 0,21 ng/mg de creatinina, que corresponde a un índice de Youden de 0,76, lo convierte en un marcador muy bueno. EL MDA, por su parte, presenta una sensibilidad del 55,1% y una especificidad del 97,6%, para un valor de 0,435 ng/mg de creatinina, correspondiendo a un índice de Youden de 0,53.

Por lo tanto, pese a la inespecificidad de estos marcadores, sabemos que tienen un alto rendimiento diagnóstico, y un comportamiento con gran relevancia clínica: sus niveles se normalizan tras la intervención quirúrgica de los pacientes. De esta manera, ante un sujeto diagnosticado de tumor vesical, los marcadores pueden tener utilidad para detectar recidivas tumorales durante el seguimiento (esta hipótesis no pudo ser comprobada en nuestra investigación debido a no haber registrado recidivas durante el tiempo del estudio).

Esta incertidumbre a cerca de cuál puede ser el uso clínico de los marcadores de estrés oxidativo es una pregunta recurrente. Ya en el año 1994, Halliwell (161) planteaba esta cuestión, haciendo hincapié en la necesidad de desarrollar nuevas investigaciones que ayuden a esclarecer estas cuestiones. Recientemente, Cooke y colaboradores (142) realizaron una revisión crítica de la bibliografía valorando el

posible uso clínico de los marcadores de estrés oxidativo. Uno de los principales problemas que señalan es la heterogeneidad existente tanto en la metodología de medición (tanto en las técnicas empleadas cómo en la muestra a analizar – plasma, tejidos, orina) como en la nomenclatura e incluso en las unidades en las que se expresan los resultados, destacando la importancia de estandarizar procedimientos para poder sacar conclusiones más claras. Sin embargo, si que concluyen que los marcadores han probado su relación con diferentes patologías, en las que su papel principal puede ser como marcadores de actividad y pronóstico, con un potencial uso para el seguimiento y monitorización del tratamiento.

Para poder desarrollar este uso potencial, serían necesarias más investigaciones que aclaren el comportamiento de los marcadores durante el seguimiento, así como sus modificaciones en relación con las terapias adyuvantes que son necesarias para el tratamiento de estos tumores (principalmente instilaciones de Mitomicina C y BCG). Igualmente es necesario esclarecer el comportamiento de los biomarcadores en relación con los marcadores pronósticos de la enfermedad: número de tumores, tamaño tumoral, grado histológico y estadio. En nuestro estudio no se han encontrado diferencias significativas entre los niveles de los marcadores según estos factores, posiblemente porque el tamaño muestral no es lo suficientemente grande.

En cuanto a los niveles de 8-hidroxi-d-guanina, presentan un comportamiento opuesto al de los dos marcadores reseñados previamente. Esta relación inversa con la presencia de tumor vesical se comprueba al apreciarse un incremento de los valores de 8-OHdG tras la resección tumoral quirúrgica. Estos resultados no se corresponden con los datos presentes en la bibliografía. Como señalamos en la introducción de este trabajo, la 8-OHdG representa la alteración sobre el ADN producida por estrés oxidativo más frecuentemente estudiada. La hipótesis de partida de esta tesis, basándonos en los datos presentes en la bibliografía, era que los niveles de 8-OHdG debían ser superiores en los pacientes con tumor vesical que en los pacientes sanos. En este sentido, Chiou y colaboradores (113) demostraron la presencia de niveles superiores de 8-OHdG en la orina de pacientes que presentaban tumor vesical frente a controles sanos. Realizaron las mediciones en orina de la primera micción de la mañana emitida espontáneamente, empleando test de ELISA con una metodología analítica igual a la que seguimos para este trabajo. Del mismo modo, Chiang et al (162) realizan

un trabajo similar, midiendo, igualmente, los niveles urinarios de 8-OHdG mediante ELISA en pacientes con y sin tumor vesical, encontrando que los niveles eran superiores en los pacientes con carcinoma urotelial vesical, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Este comportamiento aparece confirmado en la bibliografía en relación con diferentes enfermedades. En este sentido, Cooke y colaboradores (70) realizaron una extensa revisión sistemática analizando el papel de la 8-OHdG en múltiples patologías. El comportamiento general de este marcador es presentar niveles superiores en los pacientes enfermos que en los sanos. En patología oncológica sucede lo mismo, haciendo mención a los niveles urinarios. Según este trabajo, los niveles urinarios de 8-OHdG en pacientes con cáncer son más elevados que en pacientes sanos, persistiendo más elevados pese al tratamiento oncológico que, por su enfermedad concreta, precisasen. Si bien no se hace mención concreta a patología uro-oncológica, este comportamiento es el encontrado en la casi totalidad de la bibliografía. Otro estudio llevado a cabo Erhola y cols (163), valoró las modificaciones de los niveles urinarios de 8-OHdG en relación con el tratamiento radioterápico o quimioterápico del cáncer de pulmón. Observaron que los pacientes con cáncer epidermoide de pulmón tratados con quimioterapia, con respuesta parcial o completa, presentaban un descenso en los niveles urinarios de 8-OHdG. Por el contrario, aquellos que no respondieron al tratamiento presentaron un aumento de sus niveles de 8-OHdG. Así mismo, vieron que aquellos pacientes que fueron tratados con radioterapia presentaban un incremento de los niveles de 8-OHdG mientras estaban recibiendo sesiones, normalizándose los niveles al completar el tratamiento radioterápico. Por otra parte, los pacientes que tenían carcinoma microcítico de pulmón, no mostraron cambios en los niveles urinarios de 8-OHdG, independientemente del tipo de tratamiento al que fueron sometidos.

Vale la pena destacar el trabajo realizado por Rossner et al (164), en el que valoran los niveles urinarios de 15-F2t-isoprostano y de 8-OHdG en mujeres sanas y mujeres con cáncer de mama. Valoraron también el efecto que los distintos tratamientos podían ejercer sobre estos niveles (quimioterapia y radioterapias adyuvantes). Si bien encuentran niveles urinarios elevados de 15-F2t-Isoprostano en pacientes con cáncer de mama, y relación de estos niveles con el pronóstico de la enfermedad, no encuentran esta relación con la 8-OHdG. Refieren que los niveles de este marcador son iguales al grupo control, pero que, si eliminan del análisis a aquellos pacientes que fueron sometidos a radioterapia, entonces el comportamiento observado de la 8-OHdG es

similar al que hemos encontrado en este trabajo, es decir, los niveles son inferiores en los pacientes con cáncer de mama que en los pacientes sanos. No aportan una explicación de este fenómeno.

En cuanto a las mediciones, la metodología empleada para la determinación analítica de este marcador ya ha quedado discutida anteriormente en este mismo apartado, siendo el método empleado en este trabajo válido y de uso habitual para medir la 8-OHdG. Además, se estudiaron los posibles factores de confusión que pudieran influir en los niveles de los marcadores, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos atendiendo a dichos factores.

No hemos encontrado una explicación clara que justifique el comportamiento de este marcador en nuestra serie. Existen, sin embargo, parámetros que no se han valorado en este estudio y que pudieran explicar los resultados obtenidos.

Como señalamos previamente, existen diferencias en la proporción de pacientes diabéticos entre los grupos de estudio, existiendo mayor proporción el grupo de casos. No se encontraron diferencias entre diabéticos y no diabéticos a la hora de comparar los niveles entre el grupo de casos y el de controles. Sin embargo, en el análisis intra-sujetos, encontramos que los pacientes diabéticos presentan niveles postoperatorios inferiores a los preoperatorios mientras que los no diabéticos elevan sus niveles tras la cirugía, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,03$). Pese a que se analizó la presencia de diabetes, como factor relacionado con estrés oxidativo, no se estudió la influencia del tratamiento. Existen estudios que indican que tanto la Metformina (165) como la Insulina (166)(167) reducen los niveles urinarios de 8-OHdG. Considerando que existen más pacientes diabéticos en el grupo de casos, y que estos llevan tratamiento para esta patología, esta podría ser una de las causas que justifiquen estas diferencias.

Igualmente, el papel del consumo de alcohol no ha podido ser estudiado adecuadamente. Recogimos en la historia clínica si el paciente presentaba consumo patológico de alcohol. Esta definición es ambigua. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el consumo excesivo o patológico de alcohol como un “patrón de consumo que excede un estándar de consumo moderado o —de manera más ambigua— consumo social”. Se define normalmente como el consumo que supera un volumen diario determinado (p. ej., tres bebidas al día) o una cantidad concreta por ocasión (p.

ej., cinco bebidas en una ocasión, al menos una vez a la semana). En nuestro país el consumo de alcohol está socialmente aceptado, por lo que, habitualmente, un consumo leve-moderado de alcohol no se registra en las historias clínicas de los pacientes. Sabemos que el consumo de alcohol se asocia con niveles elevados de los marcadores de estrés oxidativo (168), pero, sin embargo, un trabajo publicado por Yoshida et al (169) demuestra que, pese a que el consumo de alcohol se asocia con niveles urinarios elevados de 8-OHdG, aquellas personas con consumo leve-moderado de alcohol presentan niveles más bajos que los no bebedores, en relación con la génesis de ácido úrico. Bajo este prisma, podríamos plantear la hipótesis, no confirmada, de que los pacientes de nuestro grupo de casos presentan mayor proporción de consumo leve-moderado de alcohol. Este tipo de consumo tiene un gran componente social, por lo que, el periodo de convalecencia postoperatoria conllevaría una disminución o interrupción completa del consumo, produciendo un ascenso de los niveles postoperatorios de 8-OHdG.

Otro factor que puede influir en los niveles de la 8-OHdG, son los polimorfismos de la NAT2, que determinan perfiles de acetilación lentos, intermedios y rápidos. Un trabajo llevado a cabo por Lino y colaboradores (170) explora el papel de estos polimorfismos, encontrando que los acetiladores rápidos e intermedios presentan niveles plasmáticos inferiores de 8-OHdG, con respecto a los acetiladores lentos. Si bien existe evidencia de que, precisamente, los acetiladores lentos tienen mayor riesgo de desarrollar tumor vesical (171), no conocemos cómo es el perfil de acetilación de nuestra muestra.

Si bien los resultados del presente trabajo son muy interesantes y abren nuevas puertas al posible uso de los marcadores de estrés oxidativo en la práctica clínica, existen limitaciones metodológicas que deben ser tenidas en cuenta.

En primer lugar, el diseño del estudio. Al realizar un estudio de casos y controles sin selección pareada de casos, hemos introducido posibles sesgos de selección. Aunque se ha estudiado el papel de aquellos factores que han quedado distribuidos heterogéneamente entre los grupos, debería estudiarse en grupos homogéneos, asegurándonos que los resultados encontrados se deben al único factor que difiere, que es el que queremos estudiar (en nuestro caso, presencia de tumor vesical). Esta asimetría es más destacable en la distribución por sexos. La epidemiología del cáncer vesical nos señala que es mucho más frecuente en varones que en mujeres, lo que se vio reflejado

en la composición de los grupos de estudio. Sin embargo, para estudiar adecuadamente el papel de estos marcadores debemos comprobar su variación con respecto al sexo. En este trabajo esto no se ha podido realizar adecuadamente dado la baja proporción de mujeres. Tal es así, que tan sólo disponíamos de una muestra de orina postoperatoria para el estudio de los marcadores proveniente de una mujer. Por ello, y pese a que se ha intentado corregir estas fallas mediante el análisis estadístico, consideramos importante realizar estudios con grupos comparables de hombres y mujeres.

El papel que los diferentes tratamientos crónicos puede ejercer sobre estos marcadores también debería ser estudiado con más precisión. Valorar adecuadamente el rol que los distintos tratamientos ejercen sobre los niveles urinarios y plasmáticos de los marcadores de estrés oxidativo es complejo. En primer lugar, centrándonos en pacientes con tumor vesical, sabemos que son pacientes de edad avanzada, donde un factor casi omnipresente es la polifarmacia. Entender las múltiples interacciones entre fármacos y poder aislar su efecto para valorar los niveles de estrés oxidativo requiere estudios amplios y complejos, con un tamaño muestral grande que permita valorar cada uno de estos factores por separado. Además, analizar estos resultados puede ser difícil, ya que al valorar tantas variables simultáneamente se pueden encontrar “asociaciones” debidas al azar, lo que hace estos estudios aún más complicados.

Basándonos en los resultados encontrados en la presente Tesis, en la que hemos comprobado que los niveles urinarios del 15-F2t-Isoprostano y del MDA están elevados en pacientes con tumor vesical y disminuyen igualándose con los pacientes sanos tras la cirugía, podemos especular con su papel para el seguimiento de esta patología y detección de recidivas. Por ello, se antoja necesario realizar trabajos que valoren el comportamiento de los marcadores durante el seguimiento de estos pacientes, para entender como se comportan ante una recidiva tumoral, cómo se comportan si el tumor progresa, cómo se expresan los marcadores en estadios más avanzados (T2 en adelante) y cómo son influidos por las diferentes terapias adyuvantes.

VI. CONCLUSIONES

1.- Los pacientes que padecen tumor vesical presentan niveles urinarios superiores de 15-F2t-Isoprostano y de Malondialdehido, e inferiores de 8-OH-desoxiguanosina en comparación con el grupo de controles.

2.- Un mes después de ser sometidos a cirugía (resección transuretral de tumor vesical) los niveles urinarios de todos los marcadores en el grupo de casos se igualan con los del grupo de controles.

3.- No se han encontrado diferencias en los niveles urinarios de los marcadores de estrés oxidativo en relación con la presencia de hábito tabáquico, diabetes mellitus, cardiopatía isquémica, hipertensión o dislipemia.

4.- No se ha demostrado asociación entre el estadio tumoral, grado de diferenciación histológica, tamaño o número de tumores y los niveles urinarios de los marcadores de estrés oxidativo

5.- Los marcadores estudiados en la presente Tesis presentan una Sensibilidad y Especificidad adecuadas, superiores a la de la citología y del NMP22 en nuestra serie; por lo que pueden constituir herramientas útiles en el seguimiento del tumor vesical.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. In: *Urology*. 2005. p. 4–34.
2. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez Gómez B, Barrera VH, Lope V, et al. COLABORACIÓN ESPECIAL Situación del cáncer en España: incidencia State of cancer in Spain: incidence. *An Sist Sanit Navar An Sist Sanit Navar*. 2004;27(272):165–73.
3. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;
4. Madeb R, Messing EM. Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality. *Urol Oncol*. 2004;22(2):86–92.
5. Bernal-Pérez M, Souza DLB, Romero-Fernández FJ, Gómez-Bernal G, Gómez-Bernal FJ. Estimación de las proyecciones del cáncer de vejiga en España. *Actas Urol Esp*. 2013;37(5):286–91.
6. Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Rev Urol*. 2008;10(1):31–43.
7. Ferrís J, Garcia J, Berbel O, Ortega J a. Constitutional and occupational risk factors associated with bladder cancer. *Actas Urol Esp*; 2013;37(8):513–22.
8. Malats N. Genetic epidemiology of bladder cancer: scaling up in the identification of low-penetrance genetic markers of bladder cancer risk and progression. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2008;(218):131–40.
9. Ferrís J, Berbel O, Alonso-López J, Garcia J, Ortega JA. Environmental non-occupational risk factors associated with bladder cancer. *Actas Urol Esp*. 2013 Oct;37(9):579-86.
10. Golka K, Wiese A, Assennato G, Bolt HM. Occupational exposure and urological cancer. *World J Urol*. 2004;21(6):382–91.

11. Pira E, Piolatto G, Negri E, Romano C, Boffetta P, Lipworth L, et al. Bladder cancer mortality of workers exposed to aromatic amines: A 58-year follow-up. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(14):1096–9.
12. Silverman DT, Hoover RN, Albert S, Graff KM. Occupation and cancer of the lower urinary tract in Detroit. *J Natl Cancer Inst.* 1983;70(2):237–45.
13. Thériault G, Tremblay C, Cordier S, Gingras S. Bladder cancer in the aluminium industry. *Lancet.* 1984;1(8383):947–50.
14. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med.* 1996;74:297–312.
15. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011 Aug 17;306(7):737-45.;
16. Chen CH, Shun CT, Huang KH, Huang CY, Tsai YC, Yu HJ, et al. Stopping smoking might reduce tumour recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* 2007;100(2):281–6.
17. Skipper PL, Tannenbaum SR, Ross RK, Yu MC. Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(6):503–7.
18. Milojevic B, Djokic M, Sipetic-Grujicic S, Milenkovic-Petronic D, Vuksanovic A, Dragicevic D, et al. Bladder cancer after managing upper urinary tract transitional cell carcinoma: Risk factors and survival. *Int Urol Nephrol.* 2011;43(3):729–35.
19. Azémar MD, Comperat E, Richard F, Cussenot O, Rouprêt M. Bladder recurrence after surgery for upper urinary tract urothelial cell carcinoma: Frequency, risk factors, and surveillance. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2011. p. 130–6.
20. Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol Oncol.* 2012;30(2):199–211.

21. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol.* 1984;119(4):510–5.
22. Chow WH, Lindblad P, Gridley G, Nyrén O, McLaughlin JK, Linet MS, et al. Risk of urinary tract cancers following kidney or ureter stones. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(19):1453–7.
23. Carrasco-Valiente J, Anglada-Curado FJ, Aguilar-Melero P, González-Ojeda R, Muntané-Relat J, Padillo-Ruiz FJ, et al. State of acute phase markers and oxidative stress in patients with kidney stones in the urinary tract. *Actas Urol Esp* 2012;36(5):296–301.
24. Shaw J, Lewis MA. Bladder augmentation surgery--what about the malignant risk? *Eur J Pediatr Surg.* 1999;9 Suppl 1:39–40.
25. Hall P. Radiation-associated urinary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008;(218):85–8.
26. Reuter VE, Grossman HB, Blute ML, Soloway MS, Dinney CPN, Liou LS, et al. The pathology of bladder cancer. *Urology.* 2006. p. 11–8.
27. Bostwick DG, Mikuz G. Urothelial papillary (exophytic) neoplasms. *Virchows Archiv.* 2002. p. 109–16.
28. ORNSTEIN D. Pathology and Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *The Journal of Urology.* 2004. p. 2511–2511.
29. Humphrey PA. Urinary bladder pathology 2004: An update. *Annals of Diagnostic Pathology.* 2004. p. 380–9.
30. Liu L, Cheng L. Grade 1 Urothelial Carcinoma Versus PUNLMP. *Pathology Case Reviews.* 2008. p. 144–8.
31. Hudson MA, Herr HW. Carcinoma in situ of the bladder. *J Urol.* 1995;153(3 Pt 1):564–72.
32. McKenney JK, Gomez JA, Desai S, Lee MW, Amin MB. Morphologic expressions of urothelial carcinoma in situ: a detailed evaluation of its histologic patterns with emphasis on carcinoma in situ with microinvasion. *Am J Surg*

- Pathol. 2001;25(3):356–62.
33. Zhai QJ, Black J, Ayala AG, Ro JY. Histologic variants of infiltrating urothelial carcinoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2007. p. 1244–56.
 34. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. *Clinical Oncology*. 2009.
 35. Witjes JA, Comp erat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Leuret T, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: Summary of the 2013 guidelines. *European Urology*. 2014. p. 778–92.
 36. Boustead GB, Fowler S, Swamy R, Kocklebergh R, Hounscome L. Stage, grade and pathological characteristics of bladder cancer in the UK: British Association of Urological Surgeons (BAUS) Urological Tumour registry. *BJU Int*. 2014;113(6):924–30.
 37. Burger M, van der Aa MNM, van Oers JMM, Brinkmann A, van der Kwast TH, Steyerberg EC, et al. Prediction of Progression of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer by WHO 1973 and 2004 Grading and by FGFR3 Mutation Status: A Prospective Study. *Eur Urol*. 2008;54(4):835–44.
 38. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. In: *The American journal of surgical pathology*. 1998. p. 1435–48.
 39. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic Grading of Noninvasive Papillary Urothelial Neoplasms. *Eur Urol*. 2007;51(4):889–98.
 40. Sidhu R, Bhatt S, Dogra VS. Ultrasonography of the urinary bladder. *Ultrasound Clin*. 2010;5(4):457–74.
 41. Blick CGT, Nazir S a., Mallett S, Turney BW, Onwu NN, Roberts ISD, et al. Evaluation of diagnostic strategies for bladder cancer using computed tomography (CT) urography, flexible cystoscopy and voided urine cytology: Results for 778 patients from a hospital haematuria clinic. *BJU Int*. 2012;110(1):84–94.

42. Shinagare AB, Sadow CA, Sahni VA, Silverman SG. Urinary bladder: Normal appearance and mimics of malignancy at CT urography. *Cancer Imaging*. 2011. p. 100–8.
43. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*. 2009;22 Suppl 2:S53–9.
44. Raitanen MP, Aine R, Rintala E, Kallio J, Rajala P, Juusela H, et al. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol*. 2002;41(3):284–9.
45. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. In: *Urology*. 2005. p. 35–63.
46. van der Aa MNM, Steyerberg EW, Bangma C, van Rhijn BWG, Zwarthoff EC, van der Kwast TH. Cystoscopy Revisited as the Gold Standard for Detecting Bladder Cancer Recurrence: Diagnostic Review Bias in the Randomized, Prospective CEFUB Trial. *J Urol*. 2010;183(1):76–80.
47. Musquera M, Mengual L, Ribal MJ. [Non-invasive diagnosis bladder cancer: new molecular markers and future perspectives]. *Arch españoles Urol* 2013;66(5):487–94.
48. Kumar A, Kumar R, Gupta NP. Comparison of NMP22 BladderChek test and urine cytology for the detection of recurrent bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2006;36(3):172–5.
49. Wirth MP, Hakenberg OW. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *European Urology*. 2006. p. 196.
50. Kibar Y, Goktas S, Kilic S, Yaman H, Onguru O, Peker AF. Prognostic value of cytology, nuclear matrix protein 22 (NMP22) test, and urinary bladder cancer II (UBC II) test in early recurrent transitional cell carcinoma of the bladder. *Ann Clin Lab Sci*. 2006;36(1):31–8.
51. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, Hautmann SH, Posey JT, Duncan RC, et al. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening

- comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-stat tests. *Cancer*. 2002;95(1):61–72.
52. Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TRL, et al. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technology Assessment*. 2010. p. 1–331.
53. Van Rhijn BWG, Van Der Poel HG, Van Der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: A systematic review. *European Urology*. 2005. p. 736–48.
54. Frigerio S, Padberg BC, Strebel RT, Lenggenhager DM, Messthaler A, Abdou MT, et al. Improved detection of bladder carcinoma cells in voided urine by standardized microsatellite analysis. *Int J Cancer*. 2007;121(2):329–38.
55. Pariente JL, Bordenave L, Michel P, Latapie MJ, Ducassou D, Le Guillou M. Initial evaluation of CYFRA 21-1 diagnostic performances as a urinary marker in bladder transitional cell carcinoma. *J Urol*. 1997;158(2):338–41.
56. Melissourgos ND, Kastrinakis NG, Skolarikos A, Pappa M, Vassilakis G, Gorgoulis VG, et al. Cytokeratin-20 immunocytology in voided urine exhibits greater sensitivity and reliability than standard cytology in the diagnosis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2005;66(3):536–41.
57. Margel D, Pevsner-Fischer M, Pevsner-Fischer M, Baniel J, Yossepowitch O, Cohen IR. Stress proteins and cytokines are urinary biomarkers for diagnosis and staging of bladder cancer. *Eur Urol*. 2011;59(1):113–9.
58. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Compérat E, Kaasinen E, Palou J, et al. Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS). *Eur Assoc Urol*. 2014;
59. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000; Feb;49(2 Suppl 1):3-8.
60. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1147–50.

61. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):222–30.
62. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49064–73.
63. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics.* 1998. p. 53–67.
64. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161–208.
65. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* 2000;304(1):55–68.
66. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):361–70.
67. Antonenkov VD, Grunau S, Ohlmeier S, Hiltunen JK. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(4):525–37.
68. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* 2006. p. 1755–66.
69. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245–313.
70. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003;17(10):1195–214.
71. Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat J-L. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem.* 2015;3(June):1–15.
72. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 2001;1(6):529–39.
73. Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters.* 2002. p. 1–16.

74. Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol*. 2011;31(2):95–107.
75. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*. 1996;313 (Pt 1):17–29.
76. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair*. 2006. p. 145–52.
77. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;
78. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. 1999;424(1-2):83–95.
79. Brown NS, Bicknell R. Cell migration and the boyden chamber. *Methods Mol Med*. 2001;58:47–54.
80. Matsuzawa A, Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1325–36.
81. Dreves J, Medinger M, Schmidt-Gersbach C, Weber R, Unger C. Receptor tyrosine kinases: the main targets for new anticancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2003;4(2):113–21.
82. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006.
83. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*. 2005;10:1881–96.
84. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(6):L1005–28.

85. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* (80-). 1991;253(5015):49–53.
86. Muller P a J, Vousden KH. P53 Mutations in Cancer. *Nat Cell Biol* 2013;15(1):2–8.
87. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001. p. 1191–212.
88. Lee YJ, Chen JC, Amoscato AA, Bennouna J, Spitz DR, Suntharalingam M, et al. Protective role of Bcl2 in metabolic oxidative stress-induced cell death. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 4):677–84.
89. Dastoor Z, Dreyer JL. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 9):1643–53.
90. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(22):10721–5.
91. Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins*. 1997. p. 63–7.
92. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, Fitzgerald GA. Nomenclature of isoprostanes: A proposal. *Prostaglandins*. 1997. p. 853–73.
93. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005. p. 279–86.
94. Griffiths HR, Møller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, et al. Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine*. 2002. p. 101–208.
95. Wang Z, Ciabattini G, Créminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, et al. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275(1):94–100.
96. Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I. Urinary biomarkers of oxidative status.

- Clin Chim Acta. 2012;413(19-20):1446–53.
97. Il'yasova D, Spasojevic I, Base K, Zhang H, Wang F, Young SP, et al. Urinary F2-Isoprostanes as a Biomarker of Reduced Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35(1):173–4.
 98. Il'yasova D, Wang F, Spasojevic I, Base K, D'Agostino RB, Wagenknecht LE. Urinary F2-Isoprostanes, Obesity, and Weight Gain in the IRAS Cohort. *Obesity*. 2012. p. 1915–21.
 99. Richelle M, Turini ME, Guidoux R, Tavazzi I, Métairon S, Fay LB. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett*. 1999;459(2):259–62.
 100. Pryor WA, Stanley JP. Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem*. 1975 Nov 28;40(24):3615–7.
 101. Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. 1983. p. 264–70.
 102. Hecker M, Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *J Biol Chem*. 1989;264:141–50.
 103. VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y, Marnett LJ. Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14247–52.
 104. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15(4):316–28.
 105. Duryee MJ, Klassen LW, Schaffert CS, Tuma DJ, Hunter CD, Garvin RP, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. Elsevier Inc.; 2010;49(10):1480–6.

106. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*. 2004;339(1-2):1–9.
107. Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine-source, significance and supplements. *Free Radic Res*. 2000;32(5):381–97.
108. Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev*. 1998;7(1):9–16.
109. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett*. 2000;151(1):87–95.
110. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 1991;51(3):794–8.
111. Cooke MS, Olinski R, Loft S. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(1):3–14.
112. Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M, Pritsos CA. Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(2):141–6.
113. Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: Development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta*. 2003;334(1-2):87–94.
114. Patel PR, Bevan RJ, Mistry N, Lunec J. Evidence of oligonucleotides containing 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(4):552–8.
115. Shen J, Deininger P, Hunt JD, Zhao H. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer*. 2007;109(3):574–80.

116. Banerjee M, Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF₂ alpha, in rabbit lung in situ. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 2):H660–3.
117. Tassone EJ, Perticone M, Sciacqua A, Mafri SF, Settino C, Malara N, et al. Low dose of acetylsalicylic acid and oxidative stress-mediated endothelial dysfunction in diabetes: a short-term evaluation. *Acta Diabetol.* 2015;52(2):249–56.
118. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515–40.
119. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J, et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(10):1176–83.
120. Jentsch a M, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(2):251–6.
121. Kao MPC, Ang DSC, Pall A, Struthers a D. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J Hum Hypertens.* 2010;24(1):1–8.
122. Tsuboi H, Kouda K, Takeuchi H, Takigawa M, Masamoto Y, Takeuchi M, et al. 8-hydroxydeoxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1998;138(6):1033–5.
123. Shimoi K, Kasai H, Yokota N, Toyokuni S, Kinae N. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(8):767–70.
124. Pilger A, Germadnik D, Riedel K, Meger-Kossien I, Scherer G, Rüdiger HW. Longitudinal study of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in healthy adults. *Free Radic Res.* 2001;35(3):273–80.

125. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta*. 2007;380(1-2):50–8.
126. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81–128.
127. Largillière C, Mélançon SB. Free malondialdehyde determination in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1988;170(1):123–6.
128. Bevan RJ, Durand MF, Hickenbotham PT, Kitas GD, Patel PR, Podmore ID, et al. Validation of a novel ELISA for measurement of MDA-LDL in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(5):517–27.
129. Nourazarian AR, Kangari P, Salmaninejad A. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(12):4745–51.
130. Malik UU, Siddiqui IA, Hashim Z, Zarina S. Measurement of serum paraoxonase activity and MDA concentrations in patients suffering with oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2014;430:38–42.
131. Gecit I, Aslan M, Gunes M, Pirincci N, Esen R, Demir H, et al. Serum prolidase activity, oxidative stress, and nitric oxide levels in patients with bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;
132. Basu S. F2-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1405–34.
133. Wu X, Cai H, Xiang Y-B, Cai Q, Yang G, Liu D, et al. Intra-person variation of urinary biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(4):947–52.
134. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of Oxidative Stress Study II. Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2005;38:698–710.

135. Il'yasova D, Spasojevic I, Wang F, Tolun AA, Base K, Young SP, et al. Urinary biomarkers of oxidative status in a clinical model of oxidative assault. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(6):1506–10.
136. Brys M, Morel A, Forma E, Krzeslak A, Wilkosz J, Rozanski W, et al. Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. *Mol Cell Biochem.* 2013;
137. Barocas DA, Motley S, Cookson MS, Chang SS, Penson DF, Dai Q, et al. Oxidative stress measured by urine F2-isoprostane level is associated with prostate cancer. *J Urol* 2011 Jun;185(6):2102–7.
138. Dorjgochoo T, Gao Y-T, Chow W-H, Shu X-O, Yang G, Cai Q, et al. Obesity, age, and oxidative stress in middle-aged and older women. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(12):2453–60.
139. Dalaveris E, Kerenidi T, Katsabeki-Katsafli A, Kiropoulos T, Tanou K, Gourgoulis KI, et al. VEGF, TNF-alpha and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2009.
140. Liu T, Zhong S, Liao X, Chen J, He T, Lai S, et al. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One.* 2015 Jan [cited 2015 Oct 14];10(10):e0138904.
141. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298–300.
142. Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta.* 2006;365(1-2):30–49.
143. Kaneko T, Tahara S, Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res - DN Aging Genet Instab Aging.* 1996;316(5-6):277–85.
144. Sohal RS, Kua HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses :During aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev.* 1994;74(1-2):121–33.

145. Wang C-H, Wu S-B, Wu Y-T, Wei Y-H. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238(5):450–60.
146. Taylor A, Bruno R, Traber M. Women and Smokers Have Elevated Urinary F₂-Isoprostane Metabolites: A Novel Extraction and LC–MS Methodology. *Lipids*. 2008;43(10):925–36.
147. Seet RC-S, Lee C-YJ, Lim ECH, Quek AML, Huang S-H, Khoo C-M, et al. Markers of Oxidative Damage Are Not Elevated in Otherwise Healthy Individuals With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care*. 2010;33(5):1140–2.
148. Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med*. 2008;5(3):218–28.
149. Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 2004;38(2):105–22.
150. Spasojevic I, Base K, Zhang H, Wang F, Young SP, Millington DS, et al. Urinary F₂-Isoprostanes as a Biomarker of Reduced Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2012 Jan;35(1):173-4
151. Piconi L, Quagliario L, Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2003. p. 1144–9.
152. Seet RCS, Lee C-YJ, Loke WM, Huang SH, Huang H, Looi WF, et al. Biomarkers of oxidative damage in cigarette smokers: which biomarkers might reflect acute versus chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med*. 2011 Jun 15 ;50(12):1787–93.
153. Badjatia N, Satyam A, Singh P, Seth A, Sharma A. Altered antioxidant status and lipid peroxidation in Indian patients with urothelial bladder carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2010;
154. Kaczmarek P, Buczynski A, Niemirowicz J, Gnitecki W, Kocur E, Karpinski J. [Lipids peroxidation in platelets in patients with bladder cancer treated with Mycobacterium suspension]. *Pol Merkur Lek*. 2001;11(66):484–6.
155. Gecit I, Aslan M, Gunes M, Pirincci N, Esen R, Demir H, et al. Serum prolidase activity, oxidative stress, and nitric oxide levels in patients with bladder cancer. *J*

- Cancer Res Clin Oncol. 2012;138:739–43.
156. Yossepowitch O, Pinchuk I, Gur U, Neumann A, Lichtenberg D, Baniel J. Advanced but not localized prostate cancer is associated with increased oxidative stress. *J Urol*. 2007;178(4 Pt 1):1238–43; discussion 1243–4.
 157. Hu HY, Hu ZL, Wang HQ, Liu C, Yu SJ. [Nuclear matrix protein 22 and urinary cytology test in the diagnosis of bladder cancer: a meta-analysis]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2012;50(12):1126–30.
 158. Bassi P, De Marco V, De Lisa A, Mancini M, Pinto F, Bertoloni R, et al. Non-invasive diagnostic tests for bladder cancer: a review of the literature. *Urol Int*. 2005;75(3):193–200.
 159. Gonzalo Rodríguez V, Sanz Justo L, De Miguel Santamaría I, Martínez de Iturrate Ernesto Fernández del Busto J. EMPLEO DEL NMP22 BLADDER-CHEK EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DEL CÁNCER DE VEJIGA. *Urol Oncológica Arch Esp Urol*. 2008;61(3):377–84.
 160. Feil G, Steinzl A. Tumor marker tests in bladder cancer. *Actas Urol Esp (English Ed)*. 2006;30(1):38–45.
 161. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344(8924):721–4.
 162. Chiang C-I, Huang Y-L, Huang C-Y, Shiue H-S, Chen W-J, Pu Y-S, et al. XRCC1 Polymorphisms and Urinary 8-Hydroxydeoxyguanine Levels Are Associated with Urothelial Carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124066.
 163. Erhola M, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, et al. Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS Lett*. 1997 Jun 9 [;409(2):287–91.
 164. Rossner P, Gammon MD, Terry MB, Agrawal M, Fang FZ, Teitelbaum SL, et al. Relationship between urinary 15-F2t-isoprostane and 8-oxodeoxyguanosine levels and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(4):639–44.

165. Kim J, Shon E, Kim C-S, Kim JS. Renal Podocyte Injury in a Rat Model of Type 2 Diabetes Is Prevented by Metformin. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:1–9.
166. Sakamoto M, Inoue G, Tsuyusaki K, Usui K, Watanabe M, Irie J, et al. Comparison of Oxidative Stress Markers in Type 2 Diabetes: Basal Bolus Therapy versus Twice Daily Premixed Insulin Analogs. *Intern Med.* 2010;49(5):355–9.
167. Park KS, Kim JH, Kim MS, Kim JM, Kim SK, Choi JY, et al. Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 2001;50(12):2837–41.
168. Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* 2007;81(3):177–87.
169. Yoshida R, Shioji I, Kishida a, Ogawa Y. Moderate alcohol consumption reduces urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by inducing of uric acid. *Ind Health.* 2001;39(4):322–9.
170. Lin I-S, Fan P-L, Chen H-I, Loh C-H, Shih T-S, Liou S-H. Rapid and intermediate N-acetylators are less susceptible to oxidative damage among 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) (MBOCA)-exposed workers. *Int J Hyg Environ Health.* 2013 Jul 216(4):515–20. A
171. García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: Results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet.* 2005;366(9486):649–59.